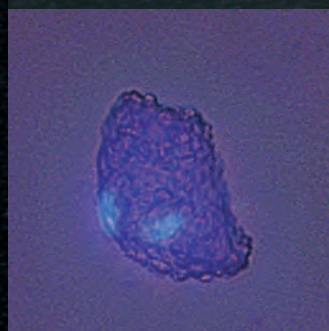
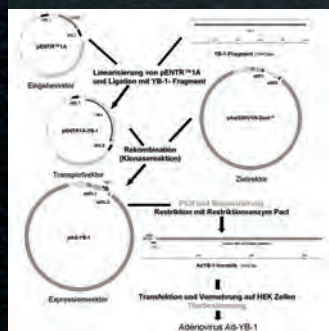
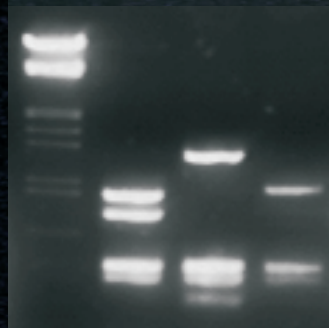


Einfluss einer adenoviralen Überexpression des SMAD Inhibitors YB-1 auf die Hypertrophie- und Apoptose-Entwicklung in isolierten adulten Herzmuskelzellen der Ratte

STEFAN PARTSCH

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. M. Diener
und dem
Institut für Humanphysiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuerin: Prof. Dr. G. Euler

**Einfluss einer adenoviralen Überexpression des SMAD Inhibitors YB-1
auf die Hypertrophie- und Apoptose-Entwicklung in isolierten adulten
Herzmuskelzellen der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Stefan Partsch
Tierarzt aus München

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter/-in: Prof. Dr. M. Diener
Prof. Dr. G. Euler

Tag der Disputation: 27.01.2010

Für meine Eltern und Franzi

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Bad Arolsen, 05.10.2009

Stefan Partsch

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Verzeichnis der Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
1.1 Hypertrophie.....	2
1.1.1 Pathophysiologie der Herzhypertrophie	2
1.1.2 Adrenerg induzierte Hypertrophie	3
1.1.3 Hypertrophienachweis in der Zellkultur	5
1.2 Apoptose	5
1.2.1 Mechanismus der Apoptose.....	6
1.2.2 TGFβ ₁	8
1.2.3 TGFβ/ SMAD-Signalkaskade	8
1.2.4 TGFβ ₁ induzierte Apoptose	10
1.3 Y-Box-bindendes-Protein-1 (YB-1).....	11
1.3.1 Proteinstruktur von YB-1	11
1.3.2 Biologische Funktion von YB-1	12
1.3.3 YB-1 als Transkriptionsfaktor	13
1.3.4 Einfluss von YB-1 auf die Translation	14
1.3.5 YB-1, TGFβ und SMAD	15
1.4 Fragestellung.....	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Tiere	18
2.1.2 Bakterienstamm für die Bakterienkultur	18
2.1.3 Zellstamm für die Virusvermehrung	18
2.1.4 Chemikalien und Enzyme.....	18
2.1.5 Antikörper.....	21
2.1.6 Puffer und Lösungen.....	21
2.1.7 Geräte und Laborbedarf	24
2.2 Herstellung der Adenoviren	25
2.2.1 Arbeiten mit DNA	28
2.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von DNA	28
2.2.1.2 Restriktion der Plasmid-DNA	28
2.2.1.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	29
2.2.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	29
2.2.1.5 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA-Fragmenten	29
2.2.1.6 Alkoholfällung von DNA	30

2.2.1.7	Phosphatase-Behandlung linearer Plasmid-DNA	30
2.2.1.8	Auffüllen von zurückliegenden 3'-Enden.....	30
2.2.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA.....	30
2.2.1.10	Klonierung isolierter DNA-Fragmente	30
2.2.1.11	Minipräparation von Plasmid-DNA	31
2.2.1.12	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	32
2.2.1.13	Klonasereaktion	33
2.2.1.14	DNA-Sequenzierung	34
2.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion	34
2.2.3	Kompetente Zellen	35
2.2.3.1	Herstellung kompetenter Zellen	35
2.2.3.2	Transformation kompetenter Zellen	36
2.2.4	Vermehrung der HEK-Zellen	36
2.2.5	Transfektion	37
2.2.6	Anzucht der Viren auf HEK-Zellen	37
2.2.7	Titerbestimmung der Viren	38
2.3	Isolierung und Zellkultur von ventrikulären Kardiomyozyten	40
2.3.1	Versuchstiere	40
2.3.2	Präparation ventrikulärer Kardiomyozyten aus Rattenherzen	40
2.3.3	Vorinkubation der Kulturschalen für die Kardiomyozyten.....	41
2.3.4	Ausplattieren der Kardiomyozyten	41
2.3.5	Kultivierung der Kardiomyozyten.....	41
2.3.6	Behandlung der Kardiomyozyten	41
2.4	Nachweis von RNA	42
2.4.1	Isolierung von Gesamt RNA.....	42
2.4.2	DNase-Behandlung	42
2.4.3	Bestimmung der RNA Konzentration	43
2.4.4	Reverse Transkription	43
2.4.5	Realtime-PCR	43
2.4.5.1	Verwendete Primer in der Realtime-PCR.....	45
2.4.5.2	PCR-Ansatz	45
2.4.5.3	Laufprogramme der Realtime-PCR.....	45
2.4.5.4	Auswertung der PCR	46
2.5	Proteinnachweis.....	47
2.5.1	Isolierung von Gesamtprotein	47
2.5.2	Proteinmengenbestimmung	47
2.5.3	Lämmli-Färbung.....	48
2.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	48
2.5.5	Western-Blot	50
2.5.6	Auswertung des Western-Blot.....	53
2.6	Immunfluoreszenz	53
2.7	Erfassung von Hypertrophie in Herzmuskelzellen.....	54
2.7.1	Hypertrophiestimulation in isolierten Herzmuskelzellen	54
2.7.2	Hypertrophieerfassung durch Ermittlung der Zellgröße.....	54
2.7.3	Hypertrophieerfassung durch Bestimmung der Proteinbiosyntheserate	55
2.8	Erfassung von Apoptose in Herzmuskelzellen	56

2.8.1	Apoptosestimulation durch TGF β_1 in isolierten Herzmuskelzellen	56
2.8.2	Annexin-/Propidiumiodid-Färbung apoptotischer Zellen.....	56
2.8.3	Hoe 33258/ Propidiumiodid-Färbung apoptotischer Zellen	57
2.9	Computerprogramme	58
2.10	Statistik.....	59
3	Ergebnisse	60
3.1	Virusherstellung und Titerbestimmung von Ad-YB-1	60
3.1.1	Transportvektor pENTR1A-YB-1	61
3.1.2	Expressionsvektor pAd-YB-1	67
3.1.3	Das Virus Ad-YB-1	69
3.2	Virusherstellung und Titerbestimmung von Ad-GFP	70
3.2.1	pENTR1A-GFP	70
3.2.2	Expressionsvektor pAd-GFP	74
3.2.3	Das Virus Ad-GFP.....	77
3.3	Nachweis der Funktionalität der Viren.....	78
3.3.1	Anstieg der relativen YB-1 mRNA Expression	78
3.3.2	Anstieg der relativen YB-1 Proteinexpression	80
3.3.3	Verteilung von YB-1 in der Herzmuskelzelle	82
3.4	YB-1 hemmt die Phenylephrin induzierte Hypertrophie.....	84
3.4.1	YB-1 hemmt das durch PE induzierte Größenwachstum	84
3.4.2	YB-1 hemmt die Steigerung der Proteinbiosyntheserate	85
3.5	Keine Beeinflussung von Apoptose und Nekrose durch die Viren.....	86
3.6	YB-1 hemmt die TGF β_1 induzierte Apoptose.....	88
3.6.1	Hemmung der frühen Apoptosevorgänge	88
3.6.2	Hemmung der späten Apoptosevorgänge.....	90
3.7	YB-1 hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der SMAD Proteine	91
3.8	YB-1 beeinflusst nicht die Expression von SMAD 7	95
4	Diskussion	97
4.1	Adenovirale Überexpression von YB-1.....	97
4.2	Verteilung von YB-1 in der Herzmuskelzelle	98
4.3	YB-1 und Apoptose	99
4.4	YB-1 und SMADs	100
4.5	YB-1 und andere Transkriptionsfaktoren.....	101
4.6	YB-1 und Hypertrophie.....	102
4.7	Schlussfolgerung und Ausblick.....	103
5	Zusammenfassung.....	105

6	Summary	107
7	Literaturverzeichnis	108
8	Danksagung	123

Verzeichnis der Abkürzungen

AMP	Adenosinmonophosphat
ANF	Atrialer Natriuretischer Faktor
ANX	Annexin V
AP-1	Aktivator Protein-1
Aqua bidest.	Zweifach demineralisiertes Wasser
BSA	bovines Serumalbumin
Bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Col1A	$\alpha 2$ Collagen Gen
CSA	<i>cross sectional area</i> , Zellquerschnittsfläche
1,2-DAG	Diazylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylenamintetraacetat
FCS	<i>fetal calve serum</i> ; fötales Kälberserum
Fos	Proteinfamilie, die Untereinheiten von AP-1 bilden können
FRGY2	ein Y-Box Protein, das zuerst aus Eizellen von <i>Xenopus laevis</i> (Afrikanischer Krallenfrosch) isoliert wurde
HEK	<i>human embryonal kidney cells</i> ; humane embryonale Nierenzelllinie
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethansulfonsäure

Abkürzungsverzeichnis

HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
H ₂ O	Wasser
IFN	Interferon
ifu	<i>Infectious units</i> ; Infektiöse Einheiten
IgRE	<i>Interferon γ response element</i>
IP ₃	Inositol 1, 4, 5-trisphosphat
iU	<i>international unit</i> , Internationale Einheit
JDP2	c-Jun Dimerisations-Protein 2
Jun	Proteinfamilie, die Untereinheiten von AP-1 bilden können
kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinasen
mdr1-Gen	<i>multiple drug resistance gen</i> ; Gen, das für verschiedene Abwehrmechanismen gegenüber Medikamenten codiert
MHC	<i>myosin heavy chain</i> , schwere Myosin Kette,
MLC	<i>myosin light chain</i> , leichte Myosin Kette
MMP	Matrix Metalloprotease
MOI	<i>multiplicity of infection</i> ; Anzahl eingesetzter Viren pro Zelle
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i> ; RNA, die im Zytoplasma in Protein umgeschrieben wird
mRNP	<i>messenger ribonucleoprotein particle</i> ; cytoplasmatischer Partikel, der aus Proteinen und mRNA besteht
NO	<i>Nitric oxide</i> , Stickstoffmonoxid
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phenylephrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration
PI3K	Phosphatidol-Inositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
SBE	SMAD bindendes Element
SD	Standardabweichung vom Mittelwert
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMAD	<i>small mother against decapentaplegia</i> , Proteinfamilie
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TGF	<i>transforming growth factor</i> , Gewebefaktor
U	<i>unit</i> , Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
YB-1	Y-Box-Protein 1
% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent

1 Einleitung

Unter Herzinsuffizienz versteht man eine unzureichende Funktion des Herzens, die eine verminderte und nicht mehr den Anforderungen des Körpers entsprechende Förderleistung zur Folge hat. Beim Menschen stehen als Ursachen einer Herzinsuffizienz die Hypertonie und koronare Herzerkrankungen im Vordergrund (Weil & Schunkert, 2006). Bei Tieren dagegen sind vorrangig andere Erkrankungen zu nennen, so ist beispielsweise beim Hund die Insuffizienz der Mitralklappe die weitaus häufigste Herzerkrankung (Praktikum der Hundeklinik, 1989), während der Herzinfarkt kaum eine Erwähnung findet. Beim Pferd ist die Herzinsuffizienz insgesamt ein eher selten zu beobachtendes Syndrom, das, wenn es klinisch auffällig wird, meist auf einer sekundären Myokardschädigung beruht. Diese ist meist eine Folge von Erkrankungen der sonstigen Strukturen des Herzens, wie Endo- oder Perikard oder der großen Gefäße (Handbuch Pferdepraxis; 2006). Trotzdem sind grundlegende zelluläre Mechanismen, die zur Bildung der Herzinsuffizienz beitragen, oft vom Tiermodell auf dem Mensch übertragbar und rechtfertigen somit Untersuchungen am Tier.

Bei einer Herzinsuffizienz kommt es zunächst zu einer Abnahme des Herzminutenvolumens. Darauf reagiert der jeweilige Organismus kompensatorisch mit kardialen und peripheren Adaptationsmechanismen. Kurzfristig wird dabei über eine Sympathikusaktivierung die Herzfrequenz erhöht, mittelfristig folgt eine ventrikuläre Dilatation und langfristig kommt es zu myokardialen Umbauprozessen mit einer verstärkten kardialen Fibrose und zu einer Hypertrophie des Myokards und einer Zunahme des programmierten Zelltods (Narula *et al.*, 1996). Dabei ist neben dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System vor allem TGF β ein Schlüsselmediator dieser kardialen Anpassungsmechanismen an eine hämodynamische Überladung und ist deshalb entscheidend an der Pathogenese von Hypertrophie und Herzinsuffizienz beteiligt (Rosenkranz, 2004).

Trotz einer anfänglichen Funktionsverbesserung gilt die Hypertrophie von Herzmuskelzellen seit langem als Prädiktor für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz (Levy *et al.*, 2002), während der apoptotisch bedingte Verlust von Kardiomyozyten zum Endstadium einer dekompensierten Herzinsuffizienz beiträgt (Narula *et al.*, 1996).

1.1 Hypertrophie

Als Hypertrophie bezeichnet man die Vergrößerung von Geweben oder Organen durch Zunahme des Zellvolumens bei gleichbleibender Zellzahl. Eine Hypertrophie wird durch Anpassung an eine physiologisch funktionelle Mehrbelastung (z.B. Leistungsherz) oder eine pathologische Überlastung verursacht, beispielsweise bei pathologischer Volumen- oder Druckbelastung des Herzens (Pschyrembel, 1998).

Im Herzen findet eine Volumenzunahme nach abgeschlossener Embryonalentwicklung fast ausschließlich durch Hypertrophie statt, wenngleich auch beispielsweise nach Herzinfarkt eine geringe Rate an Hyperplasie (Zunahme der Zellzahl) im Myokard nachgewiesen ist (Adler *et al.*, 1998). Diese Hypertrophie im Herzen ist dabei zunächst ein physiologischer Anpassungsmechanismus an eine funktionelle Mehrbelastung. So kommt es besonders beim Menschen bei länger anhaltenden physiologischen Belastungen, wie etwa dem sportlichen Training, zu einer Zunahme der Dicke und der Länge der Herzmuskelzellen. Zudem nehmen die Wanddicke der Kammern, die Kammervolumina, das Herzgewicht und das Ruheschlagvolumen zu, während gleichzeitig die Ruhefrequenz abnimmt (Physiologie der Haustiere, 2000).

1.1.1 Pathophysiologie der Herzhypertrophie

Unter pathologischen Bedingungen finden am Herzen Anpassungsreaktionen statt, die denen des Trainings gleichen. So führt beispielsweise eine Stenose der Aortenklappe zu einer erhöhten Druckbelastung, welche die Wandspannung des linken Ventrikels ansteigen lässt. Durch die kompensatorische Hypertrophie der Wandmuskulatur wird diese Wandspannung jedoch zunächst im physiologischen Normbereich gehalten. Ein chronischer Anstieg der Wandspannung führt dagegen zu einer linksventrikulären Hypertrophie, ventrikulärer Dysfunktion und letztendlich zu einer dekompensierten hypertrophen Herzinsuffizienz, wenn keine adäquaten Maßnahmen eingeleitet werden. Durch die übermäßige Zunahme der Wanddicke kann beim Überschreiten des kritischen Herzgewichts die Blutversorgung des Herzens durch das Koronarsystem nicht mehr gewährleistet werden. Zusätzlich dazu kommt es durch das sogenannte „ventricular remodeling“, einer Einlagerung von Fibroblasten und Kollagenfasern, zu einer weiteren Beeinträchtigung der

Herzfunktion. Dadurch kommt es dann zu einer funktionellen Dekompensation der Herzarbeit in Form einer Minderversorgung aller peripheren Organe (Physiologie der Haustiere, 2000).

Bei einer Insuffizienz der Aortenklappe kommt es dagegen durch verminderte Nettopumpleistung und Rückstau des Blutes zunächst zu einer Ventrikeldilatation. Diese Volumenbelastung geht einher mit einer erhöhten Wandspannung in der Muskulatur, die dann durch eine nachfolgende Anpassungshypertrophie rückgängig gemacht wird (Physiologie der Haustiere, 2000). Bei einer Volumenbelastung des Herzens kommt es vor allem zu einer Zunahme der Länge der Kardiomyozyten, wohingegen bei einer Druckbelastung eher die Zunahme der Zellquerschnittsfläche eine Rolle spielt (Weil & Schunkert, 2006).

1.1.2 Adrenerg induzierte Hypertrophie

Das Ausmaß einer Hypertrophie wird durch eine Reihe autokriner oder parokriner Faktoren beeinflusst. Dazu zählen das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandine, Endothelin, der Atriale Natriuretische Faktor (ANF), Wachstumsfaktoren (TGF, FGF) und die Katecholamine (Reddy *et al* 1996), wie beispielsweise Noradrenalin, Adrenalin und Verwandte wie Isoprenalin oder Phenylephrin.

Die Hypertrophie-Induktion durch α -adrenerge Stimulation konnte anhand von Zellkulturmodellen isolierter Kardiomyozyten adulter Ratten gezeigt werden (Schlüter & Piper, 1992). Diese Hypertrophie wird ausschließlich über α_1 -Adrenozeptoren vermittelt, eine Existenz des α_2 -Adrenozeptor-Subtyps konnte an isolierten Kardiomyozyten nicht nachgewiesen werden (Buxton & Brunton, 1985). Auf zellulärer Ebene konnte in adulten Kardiomyozyten gezeigt werden, dass eine selektive Stimulation α_{1A} -adrenerger Rezeptoren über eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und des PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweges zur gesteigerten Hypertrophie führt (Pönicke *et al.*, 2001) und Kardiomyozyten, die eine konstitutiv aktivierte Form der Akt exprimieren zeigen eine deutliche Hypertrophie (Shioi *et al.*, 2002). Entsprechend führt eine Hemmung der PI3-Kinase zu einer Verminderung dieser Myokardhypertrophie (Schlüter *et al.*, 1998).

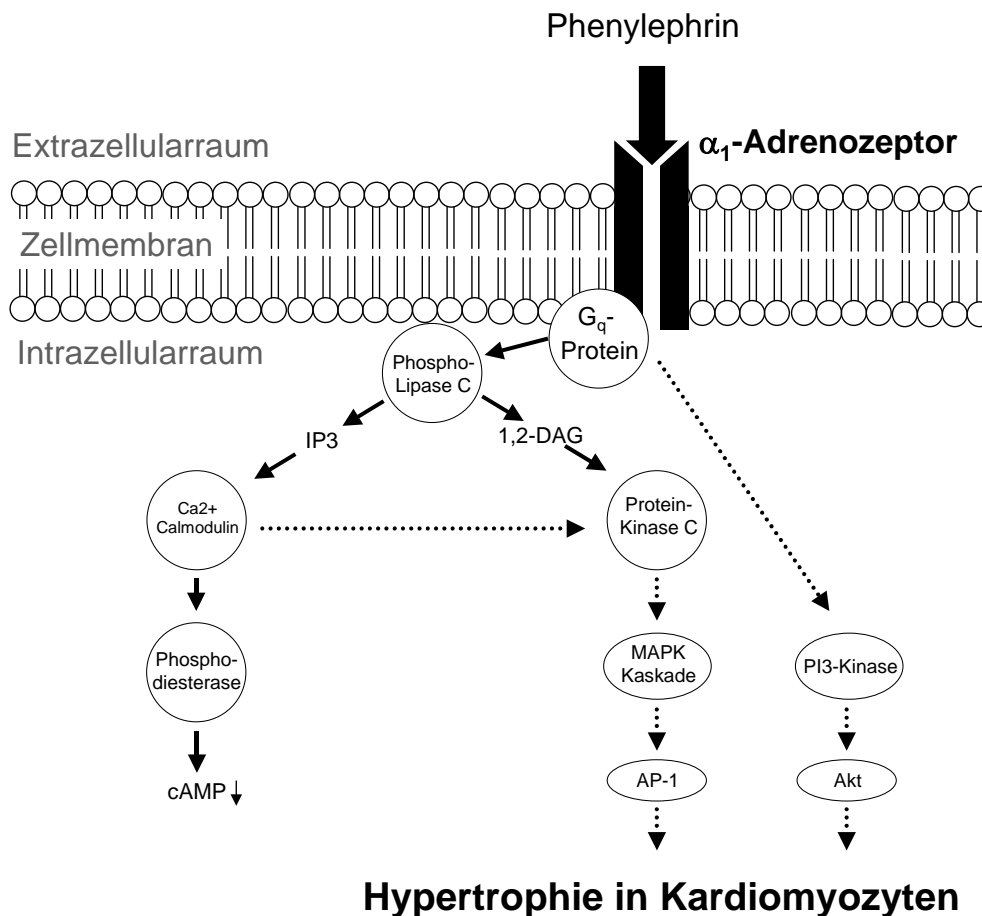


Abbildung 1.1: Signalweg der α_1 -adrenergen Stimulation. Die α_1 -adrenerge Stimulation durch Phenylephrin wird durch ein G_q -Protein vermittelt, welches die Phospholipase C aktiviert. Diese setzt Diacylglycerol (1,2-DAG) und Inositol 1, 4, 5-trisphosphat (IP₃) frei. IP₃ stimuliert unter anderem eine calmodulinabhängige Phosphodiesterase, durch welche die Konzentration des intrazellulären second messengers cAMP gesenkt wird (Physiologie der Haustiere, 2000). Das 1,2-DAG führt zur Stimulation von Proteinkinase C, die unter anderem über eine Mitogen aktivierte Protein Kinasen (MAPK) Kaskade zu einer Aktivierung von AP-1 führt (Li et. al., 2000). Des Weiteren kommt es durch Phenylephrin zur Aktivierung der Phosphatidyl-Inositol-3-(PI3)-Kinase und deren Zielprotein, der Serin-Threonin Proteinkinase Akt (Schlüter, et. al., 1998).

Best (2006) konnte in Herzmuskelzellen der Ratte zeigen, dass durch α - und β -adrenerge Stimulation eine Hypertrophie der Kardiomyozyten in Kombination mit einer erhöhten AP-1 Bindungsaktivität verursacht wird. Durch Inaktivierung des AP-1-Komplexes mittels CRE-Decoy-Oligonukleotiden konnte bewiesen werden, dass AP-1 bei der durch Phenylephrin (α -adrenerg) verursachten Hypertrophie, aber nicht bei der durch Isoprenalin (β -adrenerg) vermittelten Hypertrophie eine entscheidende Rolle zukommt (Taimor et al., 2004). Auch in verschiedenen anderen Hypertrophie-modellen konnte eine Korrelation zwischen der Induktion von AP-1 und

dem Auftreten einer kardialen Hypertrophie nachgewiesen werden. Etwa in spontan hypertensiven Ratten (Izumi *et al.*, 2000), in Renin/Angiotensin überexprimierenden Ratten (Fiebeler *et al.*, 2001), in mit Isoprenalin infundierten Tieren (Takemoto *et al.*, 1999) oder mit Hilfe der Überexpression einer dominanten negativen Mutante des AP-1-Bestandteils c-Jun in neonatalen Rattenherzmuskelzellen (Omura *et al.*, 2002). Li *et al.* (2000) zeigten, dass diese Aktivierung von AP-1 über eine MAPK-(Mitogen aktivierte Protein Kinasen)-Kaskade gesteuert wird und AP-1 dementsprechend indirekt über PKC aktiviert wird.

1.1.3 Hypertrophienachweis in der Zellkultur

Hypertrophie lässt sich anhand verschiedener Parameter nachweisen. Prinzipiell beruht die Hypertrophie der ventrikulären Muskelmasse auf einer Zellvergrößerung der Myozyten bei einer gleich bleibenden Zellzahl. Bei dieser Zellvergrößerung ist das Verhältnis zwischen Proteinsynthese und Proteindegradation zugunsten der Synthese verschoben. Daher kann man durch den Nachweis einer vermehrten Syntheserate auch die Hypertrophie beweisen. Diese vermehrte Proteinsyntheserate wird mittels der Inkorporation von ^{14}C -Phenylalanin gemessen (Morgan *et al.*, 1971). Eine vermehrte Proteinbiosyntheserate geht auch meist mit einer erhöhten Transkriptionskapazität in Form einer erhöhten RNA-Synthese einher. Eine Aussage über diese lässt sich über die Inkorporation von ^{14}C -Uridin treffen (Pinson *et al.*, 1993). Ganz anschaulich ist das vermehrte Größenwachstum einer Zelle in der Zellkultur durch einen Vergleich der Myozytenquerschnittsfläche nachweisbar (Schlüter *et al.*, 1998). Wie Schlüter und Piper (1992) nachgewiesen haben, kommt es im Rahmen der Hypertrophie zum sogenannten „fetal shift“, einer Reexpression fötaler Gene wie beispielsweise der Kreatinkinase (Isoform BB), so dass deren Nachweis ebenfalls zum Nachweis einer Hypertrophie genutzt werden kann.

1.2 Apoptose

Der griechische Begriff „Apoptose“ („απο“gr. - von, aus, ab; „ρτοσις“gr.- Senkung) bezeichnete ursprünglich das Abfallen welcher Blätter von einem Baum. Wyllie *et al.* (1980) benutzten diesen Begriff als erste als eine Metapher für das Phänomen des programmierten Zelltods. Apoptose ist ein durch spezielle Faktoren ausgelöst und

durch komplexe Regelsysteme kontrollierter Degradationsprozess, der in allen Körperzellen ablaufen kann. Eine der Hauptaufgaben der Apoptose liegt in der Beseitigung von geschädigten, infizierten oder transformierten Zellen im Organismus, in der Differenzierung von verschiedenen Geweben und Organen während der Wachstumsphase sowie der Aufrechterhaltung konstanter Organgrößen. Der Organismus ist in vielerlei Hinsicht auf die Apoptose angewiesen, so kommt es einerseits bei Inaktivierung der Apoptose zu einer unkontrollierten Zellwucherung (Wyllie, 1997), andererseits kann ein Überschuss an apoptotischen Zellen zu degenerativen Erkrankungen führen. Auch im Herzen spielt Apoptose eine große Rolle bei verschiedenen pathologischen Prozessen. So findet man Apoptose im infarzierten und reperfundierten Myokard (Freude *et al.*, 2000), im Endstadium der Herzinsuffizienz (Guerra *et al.*, 1999), während des linksventrikulären Remodelling nach einem Herzinfarkt (Sam *et al.*, 2000), bei Diabetes (Zhou *et al.*, 2000) und während der Rückbildung einer Hypertrophie (Tea *et al.*, 1999).

Die Stimulation der Apoptose kann dabei durch viele verschiedene intra- oder extrazelluläre Faktoren erfolgen. Neben verschiedenen anderen extrazellulären Signalen, wie Strahlung, Toxinen oder viraler Infektion kann Apoptose beispielsweise durch ein aktiviertes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, einen aktivierten Sympathikus, durch Ischämie oder verschiedene Zytokine stimuliert werden. In ventrikulären Herzmuskelzellen ist von dem Zytokin und Wachstumsfaktor TGF β_1 bekannt, dass er Apoptose auslöst (Euler-Taimor & Heger, 2006).

1.2.1 Mechanismus der Apoptose

Für die Entstehung der Apoptose gibt es zwei hauptsächliche Signalwege (siehe Abbildung 1.2). Der extrinsische Signalweg wird durch externe Faktoren vermittelt, die an Rezeptoren auf der Zellmembran binden. Liganden sind dabei im Kardiomyozyten beispielsweise der Tumor Nekrose Faktor α (TNF α), der an den TNFR1 (Tumor Nekrose Faktor α Rezeptor 1) bindet, welcher über ein spezifisches Adapterprotein (TRADD) zu einer Aktivierung von Caspase 8 führt. Der zweite in Kardiomyozyten nachgewiesene Ligand ist FasL (Fas Ligand), der an den Fas-Rezeptor bindet und über das Adapterprotein FADD ebenfalls zu einer Aktivierung von Caspase 8 führt.

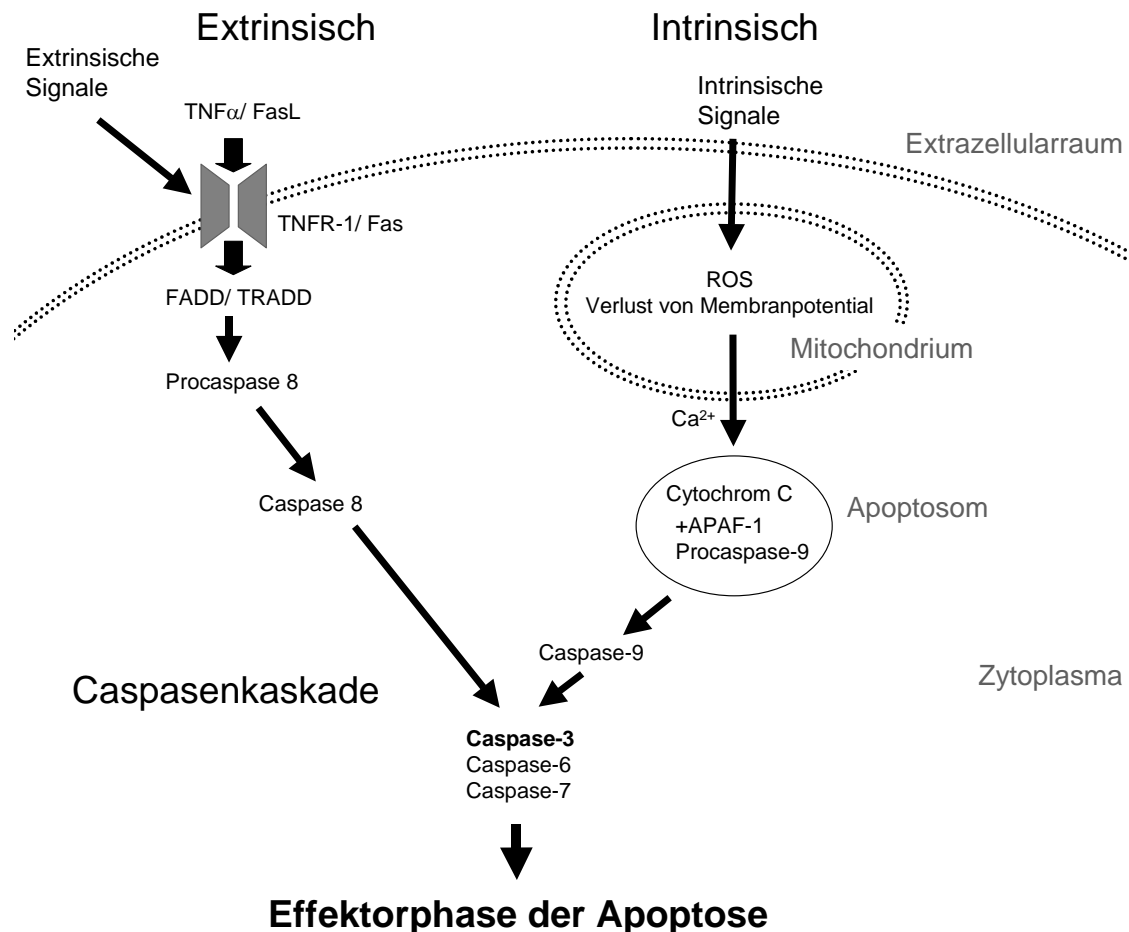


Abbildung 1.2: Schema der Apoptose

Der intrinsische Weg ist der sogenannte mitochondriale Weg. In den Mitochondrien ist eine Reihe von Substanzen enthalten, die tödlich auf die Zelle wirken, wenn sie durch eine Schädigung der Mitochondrienmembran, beispielsweise durch Strahlung oder Hypoxie, in das Cytosol gelangen. Eine dieser Substanzen ist das Protein Cytochrom C, das nach der Freisetzung aus dem Mitochondrium einen Komplex mit Procaspase 9 und dem Cofaktor APAF-1 (apoptotic protease activating factor 1) bildet. In Gegenwart von ATP kommt es dann zur Aktivierung von Caspase 9 und zur Bildung des sogenannten Apoptosoms (Bishopric *et al.*, 2001). Sowohl extrinsischer, als auch intrinsischer Weg resultieren in der Aktivierung der sogenannten Caspasenkaskade. Caspasen sind sich gegenseitig aktivierende Proteasen, die letztlich die Effektorphase einläuten.

Die Effektorphase der Apoptose beginnt mit einer Umstrukturierung der Zellmembran bei Erhaltung ihrer Integrität, die dazu führt, dass apoptotische Zellen erkannt und

phagozytiert werden können. Bei dieser Umstrukturierung findet unter anderem eine Translokation des Zellmembranbestandteils Phosphatidylserin (PS) von der inneren auf die äußere Seite der Plasmamembran statt.

Die internukleosomale DNA-Fragmentierung durch Endonukleasen (Kerr *et al.*, 1972) führt zu einer Zerschneidung der DNA in Abschnitten von 180-200 Basenpaaren (Wyllie *et al.*, 1980). Die dabei entstehenden „DNA-Leitern“ mit Sprossen im Abstand von etwa 200 Bp lassen sich auf einem DNA Gel nachweisen. Gleichzeitig findet eine Zellschrumpfung und Chromatinkondensation statt.

Im Verlauf der Apoptose kommt es zur Degradierung von Zellkomponenten und deren Abschnürung in sogenannten „apoptotic bodies“ (Ellis *et al.*, 1991). Die apoptotischen Zellen kontrahieren ihr Zytoskelett, indem sie vor allem K⁺-Ionen aus dem Cytoplasma in den Extrazellularraum ausströmen lassen, und erleichtern dadurch die Phagozytose durch beispielsweise Makrophagen. Im Gegensatz zur Nekrose findet der Prozess der Apoptose ohne jegliche Anzeichen einer Entzündung statt (Kerr *et al.*, 1972).

1.2.2 TGFβ₁

Die Superfamilie des transforming growth factors (TGF)-β, zu der TGFβ₁, das bone morphogenetic Protein (BMP) und Aktivin gehören, spielt eine wichtige Rolle bei essentiellen zellulären Funktionen. Hierzu gehören Proliferation, Differenzierung, Gewebsumbau, Angiogenese, Immunantwort und die Apoptose (Park, 2005). Die meisten Zelltypen, beispielsweise aktivierte T- und B- Lymphozyten, unreife hämatopoetische Zellen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen, Makrophagen, Endothelzellen und Herzmuskelzellen, können TGFβ₁ bilden und sind zugleich empfänglich für seine Wirkungen (Dennler *et al.*, 2002).

1.2.3 TGFβ/ SMAD-Signalkaskade

Mitglieder der TGFβ Superfamilie sind die klassischen Aktivatoren von SMAD Proteinen. Zur Zeit werden acht verschiedene SMAD (small mother against decapentaplegic) Proteine unterschieden, die sich in drei verschiedene Klassen einteilen lassen: in rezeptoraktivierte R-SMADs (SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, SMAD8), Co-SMADs (SMAD4), und inhibitorische I-SMADs (SMAD6 und SMAD7). Alle drei funktionellen Klassen sind im Herzen nachgewiesen worden (Euler-Taimor

& Heger, 2006). Für den TGF β -Signalweg im Herzen dienen je nach aktiviertem Rezeptor entweder SMAD2 und SMAD3, oder SMAD1, SMAD5 und SMAD8 als R-SMADS. SMAD4 agiert bei beiden Wegen als ein Co-SMAD, SMAD6 und SMAD7 fungieren als I-SMADS (de Caestecker *et al.*, 2000). SMAD Proteine sind rund 500 Aminosäuren lang und beinhalten zwei strukturierte Domänen, die N-terminale MH1-Domäne (MAD-Homology-Domain 1) und die C-terminale MH2-Domäne (MAD-Homology-Domain 2). Diese Domänen sind über eine Linker-Region miteinander verbunden. In allen drei Subtypen der SMAD-Proteine sind die MH2-Domänen stark konserviert und fast identisch. Die MH1-Domänen zeigen nur bei den R-SMADS und den Co-SMADS Ähnlichkeit, bei den I-SMADS variiert die N-terminale Region stark (Heldin *et al.*, 1997).

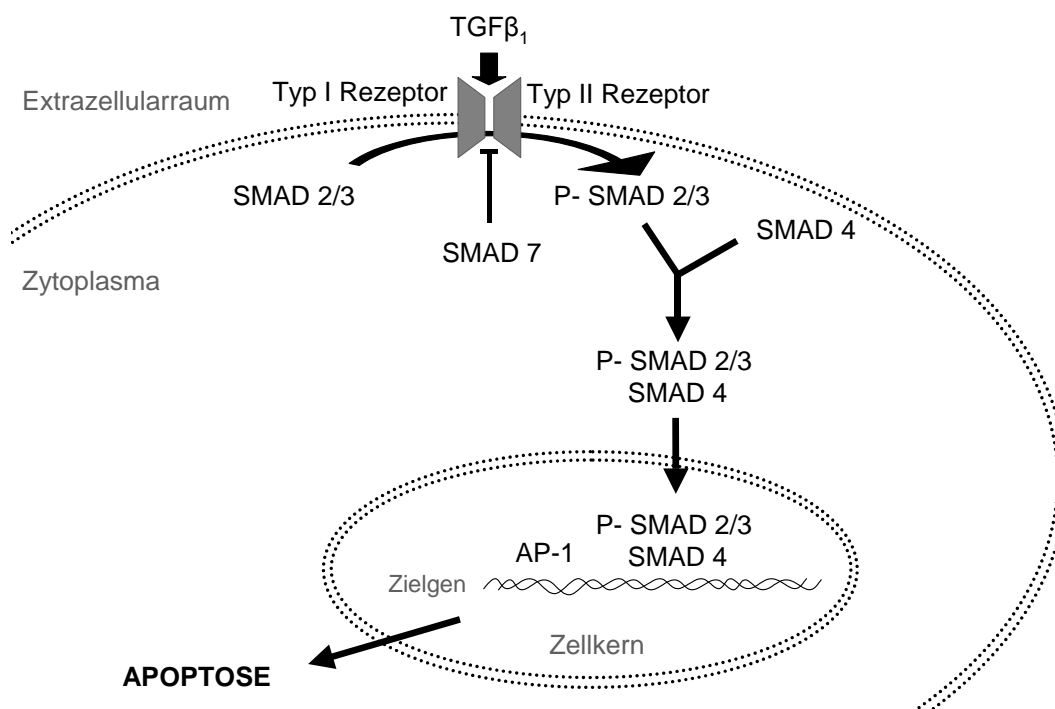


Abbildung 1.3: Schematische Wirkweise von TGF- β_1 und den SMAD Proteinen

Die Mitglieder der TGF β Superfamilie vermitteln ihre intrazelluläre Wirkung hauptsächlich über heterodimere Rezeptorkomplexe aus spezifischen TypI und TypII Serin/Threonin-Kinasen (Shi & Massague, 2003). Typ II Rezeptoren sind aktive Kinasen und phosphorylieren die Typ I Rezeptoren. Diese Typ I Rezeptoren vermitteln dann spezifische intrazelluläre Signalwege und bestimmen somit deren

Spezifität. Bislang wurden bei Säugertieren sieben Typ I Rezeptoren (ALKs = Activin Rezeptor Kinase) und fünf Typ II Rezeptoren nachgewiesen (Derynck & Feng, 1997; Massague, 1998). TGF β bindet an einen Komplex aus Typ II-R und ALK5 und führt dadurch zu einer Phosphorylierung von SMAD 2 und 3. Dadurch werden diese aktiviert und bilden anschließend über ihre MH2-Domänen einen heteromeren Komplex mit dem Co-SMAD 4. Vermutlich kommt es dabei meistens zur Bildung eines Heterotrimers, bestehend aus zwei R-SMAD Molekülen und einem Co-SMAD Molekül (Qin *et al.*, 2001) oder zu einem Hetero-Dimer aus je einem Molekül R-SMAD und Co-SMAD (Wu *et al.*, 2001). Dieser SMAD-Komplex wird in den Kern transloziert, wo er zusammen mit anderen Faktoren die Transkription verschiedener Proteine reguliert (Euler-Taimor & Heger, 2006). SMAD 7 wirkt inhibitorisch, indem es die Phosphorylierung der R-SMADs (Nakao *et al.*, 1997) hemmt. Eine schematische Darstellung dieser Abläufe gibt Abbildung 1.3.

1.2.4 TGF β_1 induzierte Apoptose

Eine vermehrte Expression von TGF β_1 und anderen Mitgliedern der TGF-Superfamilie unter pathologischen Bedingungen ist im Herzen der erste Hinweis auf einen ebenfalls aktivierten SMAD-Signalweg (Euler-Taimor & Heger, 2006). Dementsprechend findet sich im Herzen nach einem Myokardinfarkt nicht nur eine erhöhte Menge an TGF β , vor allem in der Randzone des Infarktes (Deten *et al.*, 2001), sondern auch eine Aktivierung von SMAD 2,3 und 4 (Hao *et al.*, 1999, 2000). Dieser Signalweg führt einerseits zu fibrotischen Veränderungen im Myokard (Ikeuchi *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2002), andererseits können die SMAD Proteine auch Apoptose in den Herzmuskelzellen induzieren (Schneiders *et al.*, 2005). Eine erhöhte Expression von TGF β und SMAD Proteinen ist daher immer ein Zeichen für eine negative Entwicklung in Richtung eines Herzversagens (Euler-Taimor & Heger, 2006). Taimor *et al.* konnten 2004 durch Einsatz von extrazellulär hinzugefügten doppelsträngigen Oligonukleotiden (Decoy-Oligonukleotiden) auch eine Beteiligung von AP-1 an der NO- und TGF β_1 -vermittelten Apoptose in Herzmuskelzellen der Ratte nachweisen. Um Apoptose auslösen zu können, bedarf AP-1 jedoch der Zusammenarbeit mit den SMAD Proteinen SMAD 2, 3 und 4 (Schneiders *et al.*, 2005).

1.3 Y-Box-bindendes-Protein-1 (YB-1)

YB-1 gehört zu einer evolutionär am stärksten konservierten Proteinfamilie, die sich durch das Vorhandensein einer Nukleinsäure-bindenden Proteindomäne, der Cold-Shock-domäne (CSD) auszeichnet (Graumann & Marahiel, 1996a). Sie ist während der Evolution von Prokaryonten sehr gut erhalten geblieben und man kann sie sowohl in Bakterien, Pflanzen als auch in Tieren finden.

Der Name YB-1 wurde von Didier *et al.* (1988) eingeführt, um Transkriptionsfaktoren zu benennen, die eine hohe Affinität für die Y-Box von MHC Klasse II Promotoren haben. Das Y-Box-Motiv ist eine hoch konservierte Sequenz, die eine inverse CCAAT-Box enthält und man kann sie bei einer Reihe von eukaryontischen Genen finden, wo sie in der Region der Transkriptionskontrolle liegt. Seither hat sich YB-1 als multifunktionelles Protein herauskristallisiert, das an einer Vielzahl zellulärer Funktionen beteiligt ist (Kohno *et al.*, 2003).

1.3.1 Proteinstruktur von YB-1

Das YB-1 Genom wird aus 8 Exons gebildet, die auf einer Länge von 19000 Bp genomischer DNA verteilt sind und ist lokalisiert auf Chromosom 1p34. YB-1 ist ein aus 324 Aminosäuren bestehendes Protein, das aus drei Domänen aufgebaut ist und ein Molekulargewicht von 43 kDa aufweist (Kohno *et al.*, 2003). Am N-Terminus des Proteins befindet sich eine 60 Aminosäuren lange Alanin- und Prolin-reiche Domäne. Es wird vermutet, dass sie zur Transaktivierung dient.

Mittels Kernspin-Resonanz-Spektroskopie und Röntgen-Strukturanalyse konnte gezeigt werden, dass die zentrale CSD fünf antiparallele β -Faltblattstrukturen ausbildet, die einen antiparallelen β -barrel und ein dreisträngiges β -Faltblatt formen. (Kloks *et al.*, 2002, Schnuchel *et al.*, 1993). Dazu gehören zwei RNA-Bindungsmotive, die als RNP-1 (Landsman, 1992) und RNP-2 (Graumann & Marahiel, 1996b) bezeichnet werden.

Die C-terminale Domäne besteht aus alternierenden sogenannte B/A (basic/acidic) Wiederholungen, die etwa 30 Aminosäuren lang sind und vorrangig entweder saure oder alkalische Aminosäuren enthalten (Abb. 1.4). Sie wird auch als Charged Zipper bezeichnet, da sie wie ein Reißverschluss die Dimerisierung des Proteins erleichtern kann (Izumi *et al.*, 2001). Für den C-terminalen Proteinabschnitt konnte in

Deletionsstudien gezeigt werden, dass er neben der CSD an spezifischen Interaktionen mit Einzel- und Doppelstrang-DNA sowie mRNA beteiligt ist (Kolluri *et al.*, 1992, Tafuri & Wolffe, 1992). Außerdem ist die C-terminale Domäne für die Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich (Wolffe, 1994).

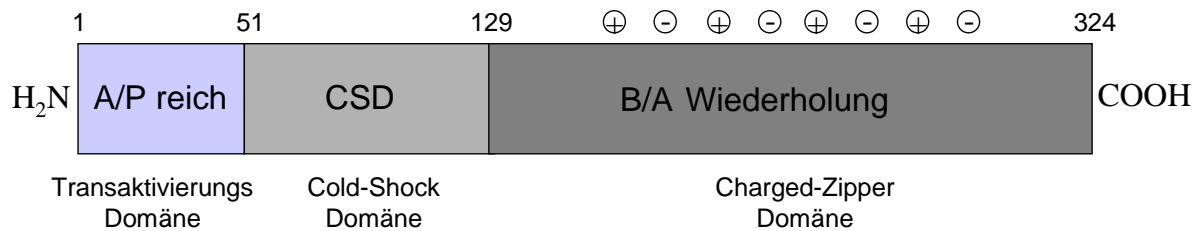


Abbildung 1.4: Organisation der drei unabhängigen Domänen bei YB-1

1.3.2 Biologische Funktion von YB-1

YB-1 ist ubiquitär in allen Geweben vorhanden und es ist an einer Vielzahl essentieller zellulärer Funktionen beteiligt, wie Transkription und Translation (Kohno *et al.*, 2003), Splicing (Stickeler *et al.*, 2001), Interaktion mit Reparaturproteinen (Marenstein *et al.*, 2001) und Detektion beschädigter RNA Moleküle (Hayakawa *et al.*, 2002).

Im Herzen vermittelt YB-1 während des Wachstums die ventrikelspezifische Expression der MLC (leichte Myosin-Kette) (Zou & Chien, 1995). Mit dem Alter nimmt die YB-1 Proteinmenge im Gehirn, im Skelettmuskel und im Herzen unter physiologischen Bedingungen jedoch deutlich ab. Bei adulten (9 Wochen) oder alten (24 Monate) Mäusen ist YB-1 so kaum mehr in diesen Geweben nachzuweisen. (Miwa *et al.*, 2006). Unter pathologischen Bedingungen ist die Expression von YB-1 allerdings auch im adulten Herzen nachweisbar. So ist experimentell bei Mäusen drei Tage nach einem myokardialen Infarkt im Infarktgebiet eine deutliche Zunahme an YB-1 Protein zu verzeichnen. Diese Expression führt vor allem zur Proliferation und Migration von Myo-Fibroblasten (Kamalov *et al.*, 2005).

YB-1 scheint auch eine zentrale Rolle bei der Regulation der Apoptose zu spielen. So ist die Expression von YB-1 in Tumorzellen hochreguliert und darüber hinaus steht eine erhöhte Expression von YB-1 in engem Zusammenhang mit schlechter

Krebsprognose und Resistenz gegenüber anticancerogenen Medikamenten (Jurchott *et al.*, 2003). YB-1 ist etwa in bösartigem Gewebe von manchen Brustkrebspatienten überexprimiert, wo es die Expression des *mdr1*-(multi drug resistance)-Gens fördert (Bargou *et al.*, 1997). Des Weiteren ist es überexprimiert bei humanem Osteosarkom (Oda *et al.*, 1998), kolorektalem Karzinom (Shibao *et al.*, 1999), serösem Ovarial-Adenokarzinom (Kamura *et al.*, 1999), Malignem Melanom (Hipfel *et al.*, 2000) und Nicht-kleinzelligem Lungentumor (Shibahara *et al.*, 2001). In metastatischen Melanomzellen führte die Suppression von YB-1 nicht nur zu einer reduzierten Proliferationsrate der Krebszellen, sondern auch zu einer größeren Anzahl an apoptotischen Zellen (Schitteck *et al.*, 2007). Die erhöhte Expression von YB-1 in den Tumorzellen ist also möglicherweise eine Ursache für das Ausbleiben der Apoptose und das übermäßige Wachstum.

Auch in anderen, nicht entarteten Zellen sind Auswirkungen von YB-1 auf die Apoptose nachgewiesen worden, so reguliert YB-1 beispielsweise in B-Lymphozyten das pro-apoptotische Gen Fas herunter (Lasham *et al.*, 2000). Umgekehrt betrachtet führt eine Inaktivierung von YB-1 in B-Vorläuferzellen zu einer erhöhten spontanen Apoptoserate in den Zellen (Swamynathan *et al.*, 2002).

1.3.3 YB-1 als Transkriptionsfaktor

YB-1 Protein ist in den meisten Zellen hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. Werden Zellen jedoch beispielsweise durch UV-Strahlung (Koike *et al.*, 1997) oder Hyperthermie (Stein *et al.*, 2001) gereizt, so wird YB-1 sofort vom Zytoplasma in den Kern transloziert. Des Weiteren können auch Interferon (IFN)- γ und TGF β eine solche Translokation von YB-1 in den Kern vermitteln (Higashi *et al.*, 2003a, 2003b).

Nach dieser Translokation in den Kern kann YB-1 als Transkriptionsfaktor wirken. Im Zellkern ist YB-1 an der Regulation der Transkription verschiedener Proteine beteiligt und kann dabei die Transkription entweder steigern oder hemmen. Es gibt grob eingeteilt drei verschiedene Wege für den Einfluss von YB-1 auf diese Transkription. Zunächst kann YB-1 an die namensgebende sogenannte Y-Box, oder auch inverse CCAAT-box (CTGATTGGC/TC/TAA) binden. Diese Sequenz ist in einer Vielfalt eukaryotischer Gene vorhanden, beispielsweise im *mdr1*-Gen, im *MLC*-Gen oder im Gen für das humane $\alpha 2$ Kollagen.

Ein weiterer Weg ist die Interaktion von YB-1 mit verschiedenen anderen Transkriptionsfaktoren an anderen Promotoren ohne Y-Box. Beispielsweise inhibiert YB-1 auf diesem Weg die Expression des Kollagen Gens Col1A in humanen Fibroblasten (Higashi *et al.*, 2003a).

Der dritte Weg ist die Bindung von YB-1 an einzelsträngige DNA im Bereich eines Promotors (Kohno *et al.*, 2003). Es unterdrückt so beispielsweise die durch γ -Interferon induzierte Transkription von MHC-II-Genen, indem es einzelsträngige Regionen innerhalb des Promotors bindet bzw. die Ausbildung von DNA-Einzelstrang-Strukturen fördert. Die so entstehende offene DNA-Struktur verhindert die Bindung anderer, positiv regulierender, Transkriptionsfaktoren (Didier *et al.*, 1988; MacDonald *et al.*, 1995; Ting *et al.*, 1994).

1.3.4 Einfluss von YB-1 auf die Translation

Am besten konnten die Regulations-Vorgänge der Translation durch Y-Box-Proteine bisher in der frühen Entwicklungsphase des Glatten Krallenfroschs *Xenopus laevis* erforscht werden. In dessen Oozyten wird mütterliche mRNA in zytoplasmatischen mRNPs gebunden und ist damit translationsinaktiv. Erst nach der Befruchtung werden spezielle Teile der mRNA aktiviert und dem Prozess der Translation zugeführt (Tafari & Wolffe., 1993). Y-Box-Proteine spielen dabei die Hauptrolle bei der Verpackung der mRNA. So wird etwa das Y-Box-Protein FRGY2 in diesen Oozyten in großer Anzahl zusammen mit der mRNA in den mRNPs gefunden und die Expression von FRGY2 fördert durch eine Maskierung der mRNA die selektive Unterdrückung der Translation (Bouvet & Wolffe, 1994).

YB-1 bindet sowohl sequenzunabhängig als auch sequenzspezifisch an mRNA (Kohno *et al.*, 2003) und ist in humanen Zellen ein wichtiger Bestandteil von nichtpolysomalen translation inaktiven mRNPs (Minich & Ovchinnikov, 1992). Evdokimova *et al.*, (2001) haben gezeigt, dass YB-1 ein potenter Cap-abhängiger Stabilisator von mRNA ist. Dabei inhibiert ein hohes YB-1/mRNA Verhältnis einerseits die Translation der jeweiligen mRNA, zum anderen schützt es aber diese auch vor dem Abbau durch zelluläre RNAsen und reguliert somit ihre Halbwertszeit (Evdokimova *et al.*, 2006). Eine Abnahme des YB-1/ mRNA Verhältnisses fördert die Bindung der Translationsinitiationsfaktoren an die 5'-Cap-Struktur der mRNA und es kommt zu einer vermehrten Translation (Nekrasov *et al.*, 2003). Hohe

Konzentrationen von YB-1 destabilisieren die Interaktion des Cap-bindenden Proteins, fördern so die Stabilität der mRNA und es kommt zu einer verringerten Translation (Kohno *et al.*, 2003).

Ein Beispiel für eine sequenzspezifische Interaktion von YB-1 mit mRNA ist die durch JNK1 (c-Jun-Kinase1) vermittelte Stabilisierung der IL-2 (Interleukin-2) mRNA in T-Zellen. Es kommt dabei zu einer spezifischen Interaktion von YB-1 und Nucleolin mit dem JNK-response-element in der 5'-Region (Chen *et al.*, 2000). Ein weiteres Beispiel für eine solche Interaktion von YB-1 ist die Verdrängung des inhibitorischen Proteins IRP2 (Eisen-regulierendes-Protein 2) vom IRE (iron-response-element) der mRNA von Ferritin. Hierdurch wird die effektive Translation von Ferritin ermöglicht (Ashizuka *et al.*, 2002).

1.3.5 YB-1, TGFβ und SMAD

Es sind in verschiedenen Geweben Interaktionen von YB-1 mit dem Zytokin TGFβ und den SMAD Proteinen nachgewiesen worden.

In Fibroblasten hemmt YB-1 die durch TGFβ induzierte Expression von Kollagen. Dabei bindet YB-1 an das Interferon-γ-response Element (IgRE) und verursacht die durch Interferon-γ (IFN) vermittelte Hemmung der Transkription des Kollagen-Gens COL1A2 in primären dermalen Fibroblasten und humanen embryonalen Nierenzellen (HEK) (Higashi *et al.*, 2003b). Als weiterer Mechanismus dieser TGFβ-Hemmung wurde in humanen Hautfibroblasten nachgewiesen, dass YB-1 an SMAD 3 bindet und die Interaktion zwischen SMAD3 und p300 verhindert. Diese Bindung erfolgt mit der CSD und der C-terminalen Region von YB-1 an die MH1-Domäne von SMAD 3. YB-1 scheint dabei nicht die Bindung von SMAD 3 an das SBE zu hemmen, sondern es kommt zu einem SMAD/ YB-1/ SBE Komplex (Higashi *et al.*, 2003a). Inagaki *et al.* (2005) konnten in einem Maus-Experiment auch in vivo den hemmenden Effekt von YB-1 auf die TGFβ/SMAD Signalkaskade hinsichtlich der Regulation des Col1A2 Kollagen-Gens nachweisen. Dafür stimulierten sie mit Kohlenwasserstoff Fibrose in den Leberzellen. Bei Mäusen mit einer Überexpression von YB-1 kam es zu einer signifikanten Erniedrigung der mRNA von Col1A2 und der Menge an Typ I Kollagen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Auch die Behandlung mit IFN-γ führte dabei zu einer Erniedrigung der Menge an Col1A2 mRNA. Eine Kombination aus adenoviraler

Überexpression von YB-1 und Behandlung mit IFN- γ führte zu synergistischen Effekten, die sich in einer nochmals verringerten mRNA Menge von Col1A2 und nochmals verringerter Fibrose auswirkten.

Dooley *et al.* (2006) haben in hepatischen Kupferschen Sternzellen nachgewiesen, dass YB-1 durch IFN- γ aktiviert wird und dieses die Expression des inhibitorischen SMAD 7 sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene steigert. Es wurde in dieser Arbeit auch ein synergistischer Effekt von TGF β und YB-1 auf diese SMAD 7 Expression nachgewiesen. In anderen humanen Zelllinien, wie in hepatozellulären Karzinomzellen (HepG2) und in humanen Fibrosarkom-Zellen konnten diese additiven Effekte ebenfalls belegt werden. In HEK293 Zellen zeigten sich zwar keine additiven Effekte von TGF β und YB-1 auf diese SMAD 7 Expression, aber YB-1 alleine verursachte auch in diesen Zellen eine Expressionssteigerung von SMAD 7. YB-1 wirkt also über die Steigerung von SMAD 7 hemmend auf die TGF β /SMAD Signalkaskade und so auch als Antagonist von TGF β (siehe Abbildung 1.3). Da diese Expressionsteigerung in mehreren verschiedenen Zelltypen nachgewiesen wurde, könnte sie durchaus ein für alle Zelltypen gültiges Prinzip sein.

Auch in Fibroblasten der Lunge wurde eine Interaktion zwischen TGF β und YB-1 nachgewiesen. Nach zweistündiger Stimulation mit TGF β wurde YB-1 dabei aus dem Cytosol in den Kern transloziert. TGF β fördert die Expression von Kollagen, indem es die Proteinkomplexbildung an einem TGF β -response element am Col1A1 Gen stimuliert und YB-1 ist an diesem Komplex beteiligt. Eine Beteiligung von SMAD Proteinen wurde dabei nicht beobachtet (Sun *et al.*, 2001).

1.4 Fragestellung

Der Übergang von adaptivem, hypertrophem Wachstum zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz geht einher mit einer erhöhten TGF β -Expression und Apoptoseinduktion. Eine zentrale Rolle, sowohl bei Hypertrophie als auch Apoptose spielt der Transkriptionsfaktor AP1, dessen Zusammensetzung dabei jeweils identisch ist. Um Apoptose zu induzieren, muss AP1 jedoch mit Transkriptionsfaktoren der SMAD-Familie interagieren, während eine Hypertrophieentstehung SMAD-unabhängig verläuft. Somit scheinen SMAD-Proteine

als Triggermoleküle zu fungieren, die eine AP-1 vermittelte Hypertrophie in eine Apoptose umwandeln können.

Als Transkriptionsfaktor hat YB-1 einen direkten Einfluss auf die Expression vieler Gene und scheint eine zentrale Rolle bei der Regulation von Apoptose zu spielen. Da für YB-1 bereits in anderen Zellen ein hemmender Einfluss auf die durch TGF β und SMAD Proteine vermittelten Effekte nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob eine Überexpression von YB-1 in Herzmuskelzellen die Apoptose-induzierende Wirkung von TGF β über SMAD Proteine hemmen kann und welchen Einfluss YB-1 auf Hypertrophie hat. Die Überprüfung dieser Fragestellung könnte zur Klärung beitragen, ob durch Inhibition der SMAD-Proteine die Entwicklung einer Herzschwäche verhindert werden kann.

Ziel dieser Studie war es somit, einen adenoviralen Vektor, der zur Überexpression von YB-1 in adulten isolierten Kardiomyozyten führt, zu generieren. Mit Hilfe dieses Adenovirus wurden die Einflüsse von YB-1 auf die durch TGF β induzierte Apoptose und SMAD-Aktivierung, sowie die durch α -adrenerge Stimulation hervorgerufene Hypertrophie in adulten Kardiomyozyten der Ratte untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Bei den Tieren handelte es sich um männliche Wistar-Ratten, die in einem Alter von 3 Monaten für die Versuche genommen wurden.

2.1.2 Bakterienstamm für die Bakterienkultur

Es wurde der Escherichia coli-Bakterienstamm XL-1-Blue MRAP2 (Stratagene, Heidelberg) verwendet.

2.1.3 Zellstamm für die Virusvermehrung

Es wurde die 293A Zelllinie (Invitrogen) genutzt.

2.1.4 Chemikalien und Enzyme

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Adeno X TM Rapid Titer Kit	Clontech, Takamara, Mountain View, USA
Ammonium-Persulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Qbiogene, Heidelberg
Annexin V	Bender medsystems, Wien
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA	Sigma, Taufkirchen
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Carbogen [®]	Linde, Pullach
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G 250 (wt/vol)	Sigma, Taufkirchen
Gateway [®] LR Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen, Karlsruhe
Collagenase, Typ CLS II	Biochrom, Berlin
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen

DMSO	Applichem, Darmstadt
DNase	Novagen, Darmstadt
DNase Puffer	Novagen, Darmstadt
EDTA-Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FCS	PAA, Cölbe
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glukose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hoechst Farbstoff 33258 (Hoe 33258)	Sigma, Taufkirchen
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Bio 101, Carlsbad, USA
Karnitin	Sigma, Taufkirchen
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Kreatin	Sigma, Taufkirchen
Kreatinphosphat	Roche, Mannheim
Laminin	Roche, Mannheim
Ligase	Biolabs, Frankfurt a.M.
Lipofectamine 2000CD	Invitrogen, Karlsruhe
Medium 199 / Earl's Salts	Biochrom, Berlin
MEM with Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgSO ₄	Merck, Darmstadt
Natriumazetat	Roth, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt
ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
OptiPro SFM	Invitrogen, Karlsruhe
¹⁴ C-Phenylalanin	Amersham, Mannheim

Material und Methoden

Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Horse serum	Dianova, Hamburg
Phenol	Merck, Darmstadt
Phenylephrin	Sigma, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Applichem, Darmstadt
Qiagen Plasmid-Maxi-Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	NEB, Frankfurt a.M.
RNAsin	Promega, Mannheim
SDS	Merck, Darmstadt
Shrimps alkalische Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
SYBR®Safe	Invitrogen, Karlsruhe
Szintillationslösung Ultimo-Gold	Canberra-Packard, Frankfurt a. M.
TEMED	Sigma, Taufkirchen
TGFβ ₁	Cell Systems, Köln
TRIS	Merck, Darmstadt
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
<u>PCR:</u> Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
10 x PCR-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
d-NTPs	Invitrogen, Karlsruhe
MgCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe
Primer	Invitrogen, Karlsruhe

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Qiagen (Hilden), Merck (Darmstadt) und Sigma (Taufkirchen) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen.

Alle verwendeten Chemikalien wurden nach Hersteller-Angaben gelöst und aufbewahrt.

2.1.5 Antikörper

Aktin	Sigma, Taufkirchen
P-SMAD1/3	Cell Signaling, NEB, Frankfurt a. M.
P-SMAD1/5	Cell Signaling, NEB, Frankfurt a. M.
P-SMAD2	Cell Signaling, NEB, Frankfurt a. M.
YB-1	Abcam, Cambridge, USA

2.1.6 Puffer und Lösungen

Häufig verwendete Puffer wurden als mehrfach konzentrierte Stammlösungen mit Millipore-Wasser angesetzt und steril filtriert. Alle Angaben beziehen sich auf einen Liter Puffer, wenn nicht anders angegeben.

<u>Arbeitsmedium für HEK-Zellen:</u>	MEM with Glutamax	445 ml
(500 ml)	Horse serum	50 ml
	Penicillin/ Streptomycin	5 ml

<u>Gefriermedium für HEK-Zellen:</u>	MEM with Glutamax	32,5 ml
(50 ml)	FCS	12,5 ml
	DMSO	5 ml

<u>LB-Medium:</u>	Bactotrypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g

Nach Autoklavieren wurde dem LB-Medium nach Bedarf Ampicillin (50 mg/l) oder Kanamycin (100 mg/l) zugegeben.

<u>LB-Platten:</u>	LB-Medium	
	Bacto-Agar	1,5%

<u>M 199/HEPES- Stammlösung:</u>	M 199	9,62 g/l
	HEPES	15,1 mM
	Ad 10 l mit Aqua bidest; pH 7,4 einstellen	

Material und Methoden

<u>CCT-Kulturmedium:</u>	M 199/HEPES-Stammlösung	x ml
	Kreatin	5 mM
	Karnitin	2 mM
	Taurin	5 mM
	Penicillin	100 IU/ml
	Streptomycin	100 µg/ml
	Cytosin-β-Arabinofuranosid	10 µM

<u>Vorplattiermedium:</u>	CCT-Kulturmedium	x ml
	FCS	4 %

Ausplattiermedium/Waschmedium

<u>für isolierte Zellen:</u>	CCT-Medium	x ml
	Streptomycin/Penicillin	2%
	Gentamycin	0,1%

Powell-Medium zur Isolierung von

<u>Herzmuskelzellen:</u>	NaCl	110,0 mM
	KCl	2,6 mM
	KH ₂ PO ₄	1,2 mM
	MgSO ₄	1,2 mM
	NaHCO ₃	25,0 mM
	Glukose	11,0 mM

<u>TE:</u>	1 M Tris pH 8,0	10 mM
	0,5 M EDTA	1 mM

<u>50 x TAE:</u>	Tris	2 M
	Eisessig	1 M
	0,5 M EDTA	50 mM

<u>DNA-Lade-Puffer:</u>	Bromphenolblau	0,25% (vol/vol)
	75% Glyzerin	30% (vol/vol)

<u>Bradford-Reagenz:</u>	Coomassie Brilliant Blue G 250	0,1% (wt/vol)
	Methanol, 96%ig	5,0% (vol/vol)
	ortho-Phosphorsäure, 85%ig	10,0% (vol/vol)
	Aqua bidest	ad 1 l
	vor Gebrauch filtrieren	
<u>10 x PBS:</u>	KCl	2,7 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
	NaCl	150,0 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	8,1 mM
<u>10 x TBS:</u>	Tris	10 mM
	NaCl	150 mM
	pH 7,4	
<u>4 x Lämmli Puffer:</u>	Tris HCl pH 6,8	0,5 mol/l
	Glycerin	25% (vol/vol)
	SDS	4% (wt/vol)
	β-Mercaptoethanol	1% (vol/vol)
	Bromphenolblau	0,1% (wt/vol)
<u>Ripa Puffer (1 ml):</u>	Ripa Stocklösung	945 µl
	PMSF (0,1 M)	10 µl
	EDTA (0,2 M)	5 µl
	β-Glycerophosphat (1 M)	40 µl
<u>Ripa Stocklösung:</u>	Tris pH7,5	50 mM
	NaCl	150 mM
	Nonidet P 40	1% (wt/vol)
	Deoxycholat	0,5% (wt/vol)
	SDS	0,1% (wt/vol)

2.1.7 Geräte und Laborbedarf

PCR und DNA-Gelelektrophorese:

Elektrophoresekammer (DNA)	GE Healthcare Europe, München
Thermocycler	Techne, Wertheim-Bestenheid
Realtime-Thermocycler	Bio-Rad, München

Zellkultur:

Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Langendorff-Apparatur	Eigenbau Physiologie, Gießen
Gewebehacker	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Mikroskop	TMS-F, Nikon, Japan

Western Blot:

ChemiDoc-System	Bio-Rad, München
Hamiltonspritze (50 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Hoefer-Elektrophoresekammer	GE Healthcare Europe, München
Hoefer-Glasplatte	GE Healthcare Europe, München
Hoefer-Spacer	GE Healthcare Europe, München
Hoefer-Kamm	GE Healthcare Europe, München
Hoefer-Plattenklemme	GE Healthcare Europe, München
Netzgerät (Typ Biometra)	Biometrische Analytik, Göttingen

Sonstige Geräte:

Anlage zur Wasserdemineralisierung	Millipore, Schwalbach
Flüssig-Szintillationszähler	Canberra-Packard, Frankfurt a. M.
Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Mikrotiterplatten-Photometer	Dynatech, Denkendorf
pH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer	Perkin Elmer, Langen

Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

Verbrauchsmaterialien:

Falcon 50 ml-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Frischhaltefolie	Aldi Süd, Mühlheim
Kulturschalen Typ: Falcon 3001, 3004	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikrotiterplatten Typ: Falcon 3910	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sterilfilter, 0,2 µm Porenweite	GE Healthcare Europe, München
Szintillationsgefäße	Canberra-Packard, Frankfurt a. M.
Zellschaber	Becton Dickinson, Heidelberg

Software:

Adobe Photoshop®	Adobe Systems, San Jose., USA
Microsoft Windows XP®	Microsoft Corp., Redmont, USA
Microsoft Word 2000®	Microsoft Corp., Redmont, USA
Microsoft Excel 2000®	Microsoft Corp., Redmont, USA
iCycler	Bio-Rad, München
Quantity One	Molecular Dynamics, Krefeld
SPSS	SPSS GmbH Software, München

2.2 Herstellung der Adenoviren

Adenoviren wurden seit ihrer Entdeckung in den frühen 1950ern ausführlich charakterisiert. Sie zeigen eine charakteristische Morphologie mit einem ikosaedralen Kapsid, bestehend aus den drei Hauptproteinen Hexon, Penton und Fiberprotein, sowie einigen kleineren Proteinen. Das virale Genom besteht aus einer linearen doppelsträngigen DNA. Adenoviren (Adenoviridae) können eine große Anzahl postmitotischer Zellen infizieren, sogar solche mit hoch differenziertem Gewebe, wie Skelettmuskel, Lunge, Gehirn und Herz. Da sie ihr Genom in den Zellkern einschleusen und zu einer schnellen Replikation führen, werden sie gerne als

Vektoren zur Untersuchung von Proteinen genutzt. Die Infektion mit Adenoviren verläuft in zwei Phasen. Die erste, oder frühe Phase, beinhaltet das Eindringen des Virus in die Wirtszelle, die Passage des Virusgenoms in den Kern und die selektive Transkription und Translation der frühen Gene. Diese frühe Phase führt zu einer Anpassung der Zellfunktionen an die Transkription und Translation der späten Gene. Es beginnt die zweite Phase, die zu Zusammenbau und Freisetzung des reifen Virus führt (Russell, 2000).

In der frühen Phase dringt das Adenovirus in die Zellen ein, indem es an den Coxsackie/Adenovirus-Rezeptor (CAR) (Bergelson *et al.*, 1997) bindet. Nach dieser Bindung an den CAR wird das Virus durch eine durch Integrin vermittelte Endozytose in die Zelle eingeschleust (Mathias *et al.*, 1998). Durch die viruseigene Protease kommt es zu einer Auflösung des viralen Kapsids und das so teilweise zertrennte Virus wird durch die Kernmembran transportiert. Virusähnliche Partikel können dabei bereits eine Stunde nach der Infektion elektronenmikroskopisch an der Kernmembran nachgewiesen werden (Dales & Chardonnet, 1973). Die folgende Transkription führt zu einem komplexen Splicing mit vier frühen "Kassetten" der Gentranskription, nämlich E1, E2, E3 und E4. E1A-Proteine führen dabei hauptsächlich zu einer Anpassung des Stoffwechsels der Wirtszelle, um diese empfänglicher für die Virusreplikation zu machen. E1B-Proteine fungieren kooperativ mit E1A-Proteinen und vermindern das Einsetzen der zellulären Apoptose. E2 Gene kodieren für Proteine zur Produktion von viraler DNA. E3-Gene vermitteln Proteine, die in vivo die zelluläre Abwehr hemmen. Die Genprodukte der E4-Kassette erleichtern den Stoffwechsel der viralen RNA, unterstützen die Replikation der viralen DNA und unterdrücken die Proteinsynthese der Wirtszelle (Russell, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem ViraPower™ Adenoviral Expression System von Invitrogen gearbeitet. Die Hauptkomponente ist dabei der Zielvektor pAd/CMV/V5-Dest™. Er basiert auf einem Adenovirus, dessen E1 und E3 Kassetten deletiert sind. Durch diese Replikationshemmung kann in der Zielzelle nur die erste Phase der Virusinfektion stattfinden und keine weitere Vermehrung. Deshalb ist es notwendig, die Viren auf einer HEK 293 Zelllinie anzuzüchten. Sie enthält eine stabil integrierte Kopie der adenoviralen E1A und E1B Gene und ermöglicht so die Vermehrung der Viren.

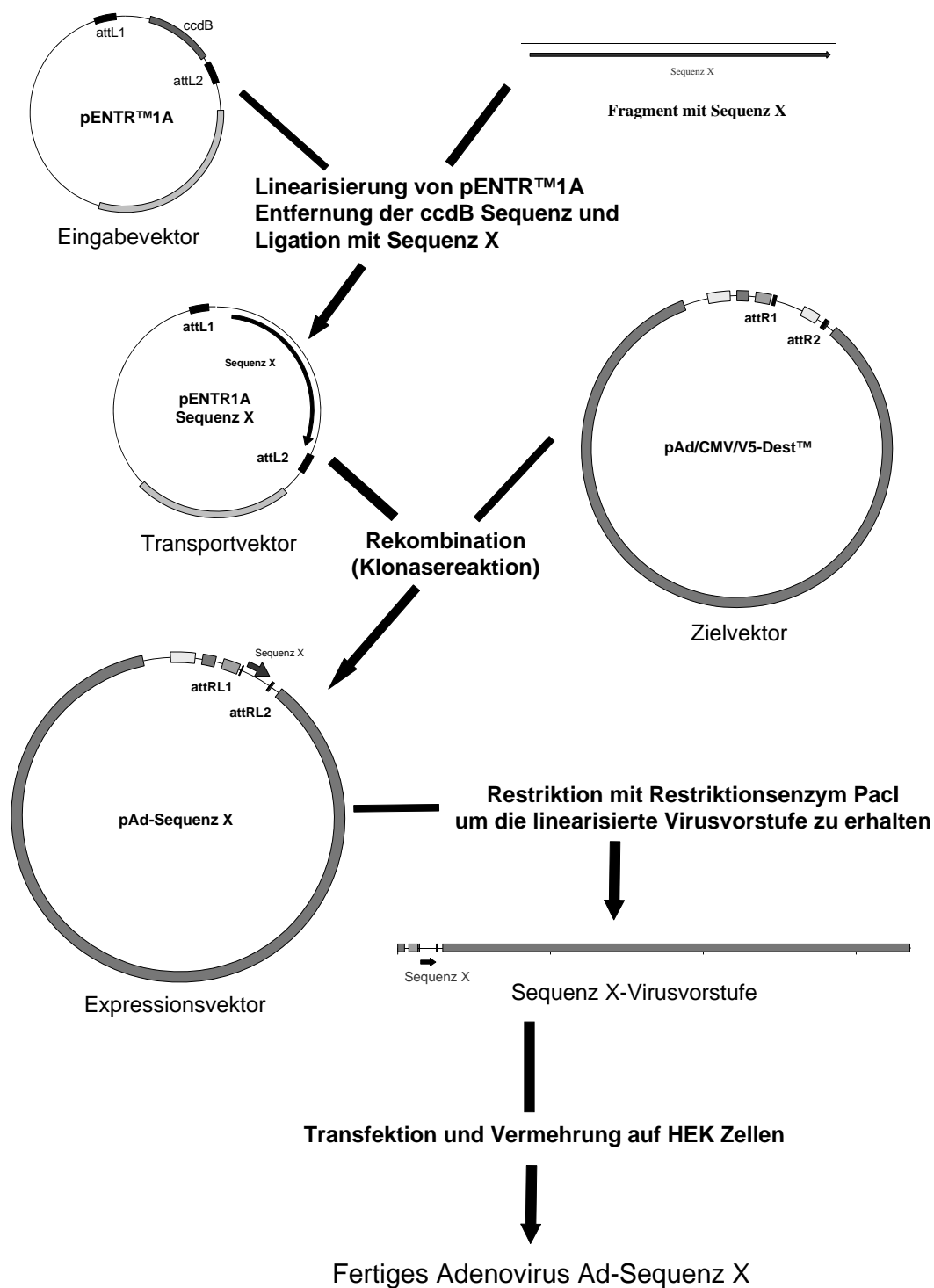


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Virusherstellung

Zur Herstellung der Adenoviren wird die codierende Sequenz zunächst in den Eingabevektor pENTRTM1A inkloniert um einen Transportvektor herzustellen. Durch

dessen deutlich geringere Größe lässt sich die Einklonierung in Leserichtung der Sequenz durch Restriktionsanalyse nachweisen. Durch eine Klonasereaktion (siehe 3.2.1.13) wird die Sequenz dann in den Zielvektor einkloniert. Der dadurch entstandene Expressionsvektor wird durch einen Restriktionsschnitt mit dem Restriktionsenzym *PacI* linearisiert und mit Hilfe einer Transfektion in die HEK-Zellen gebracht. Mit den HEK-Zellen erfolgt in mehreren Zyklen die Vermehrung des Virus und die Titerbestimmung. Mit dem aufgereinigten Virus werden dann die Herzmuskelzellen infiziert. Die Expression der einklonierten codierenden Sequenz X (YB-1 oder GFP) wird dann von dem im Vektor vorliegenden humanen Cytomegalovirus (CMV)-Promotor gesteuert. Einen schematischen Überblick zur Herstellung der Adenoviren gibt Abbildung 2.1.

2.2.1 Arbeiten mit DNA

Die hier verwendeten molekularbiologischen Methoden wurden aus den Büchern *Molecular Cloning* (Sambrook *et al.*, 1989), *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.* 1987 - 1993) und *Basic Methods in Molecular Biology* (Davis *et al.*, 1994) übernommen und gegebenenfalls verändert.

2.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Um die DNA-Konzentrationen zu bestimmen, wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Im Spektralphotometer (Perkin Elmer 557, Hitachi Ltd., Tokio, Japan) wurde die DNA-Konzentration durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Nukleinsäure-Konzentration wurde nach folgender Abschätzung berechnet: $A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$. Als zweite Methode wurde ein Bandenvergleich durchgeführt. Dafür wurde die DNA zusammen mit 1 μg λ -DNA (EcoRI/HindIII) auf einem 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt und die Intensität der λ -DNA-Banden mit der zu bestimmenden DNA-Bande verglichen.

2.2.1.2 Restriktion der Plasmid-DNA

Die Restriktion erfolgte bei der empfohlenen Temperatur (meist 37°C) in den von den Herstellern vorgegebenen Puffern für 2-3 Stunden und wurde durch Hitzeinaktivierung der Enzyme (10 min bei 65°C) beendet.

2.2.1.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die restriktionsverdaute DNA oder DNA-Amplifikate aus der PCR wurden in 1-2 % Agarose-Gelen aufgetrennt. Dafür wurde die Agarose in kochendem Aqua bidest. gelöst, mit $\frac{1}{50}$ Volumen 50xTAE-Puffer und 10 μ l SYBR®Safe (5 μ l/100 ml) versetzt und in vorbereitete Gelwannen gegossen, in die zuvor zur Aussparung von Geltaschen Plastikkämme eingehängt wurden. Nach dem Abkühlen wurden die Kämme entfernt und die Gele in Elektrophorese-Kammern mit Gelpuffer (1xTAE) überführt. Die DNA-Proben wurden mit $\frac{1}{10}$ Volumen DNA-Lade-Puffer versetzt und in die Geltaschen eingefüllt. Dann wurde die Elektrophorese bei 80-140 V ca. 40 min. durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele im UV-Licht bei 366 nm fotografiert.

2.2.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht (366 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe einer Elektro-Elution isoliert. Dazu wurde der ausgeschnittene Gelblock mit 500 μ l TE in einen Dialyseschlauch überführt und in einer mit 1xTAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer eine Stunde bei einer Spannung von 120 V eluiert. Der DNA-haltige Puffer wurde aus dem Dialyseschlauch in ein Reaktionsgefäß überführt und mit Phenol/Chloroform (1/1, v/v) extrahiert, um das SYBR®Safe zu entfernen. Anschließend wurde die DNA gefällt und in einem kleinem Volumen TE gelöst.

2.2.1.5 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA-Fragmenten

Nukleinsäuren wurden durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion von Proteinen gereinigt. Da Phenol/Chloroform und wässrige Lösungen nicht miteinander mischbar sind, findet dabei eine Phasentrennung statt. Die untere lipophile Phase bildet das Phenol/Chloroform, die DNA verbleibt in der oberen hydrophilen Phase und die Proteine sammeln sich in der Zwischenphase an. Dafür wurde ein Volumenanteil Phenol/Chloroform (1/1, v/v) mit einem Volumenanteil wässriger DNA-Lösung gemischt und anschließend zentrifugiert. Nach der Phasentrennung wurde der DNA-haltige wässrige Anteil vorsichtig abgenommen. Um Phenolreste zu entfernen, wurde der Vorgang mit Chloroform wiederholt. Danach wurde die DNA mit Ethanol gefällt.

2.2.1.6 Alkoholfällung von DNA

Die DNA wurde mit dem zweifachen Volumenanteil Ethanol (99%, v/v) und 1/10 Volumenanteil Natriumazetat-Lösung (3 M, pH 7,0) gemischt und eine halbe Stunde bei 4°C und 12.000 Upm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl Ethanol (70%, v/v) gewaschen, wiederum 15 min zentrifugiert, 15 min bei 37°C getrocknet und die DNA in der benötigten Menge TE aufgenommen.

2.2.1.7 Phosphatase-Behandlung linearer Plasmid-DNA

Phosphorylierte 5'-DNA-Enden wurden mit Hilfe von alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Durch diesen Schritt wird eine Selbstligation linearer Vektor-DNA, insbesondere Vektoren mit blunt-ends, weitgehend verhindert und damit die Ligationseffizienz der zu klonierenden Fragmente verbessert. Fünf bis zehn µg der linearisierten Vektor-DNA wurden mit 1/10 Volumenanteil 10 x Reaktionspuffer und 5 µg alkalischer Phosphatase (1 U/µl) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Durch Hitze-Inaktivierung (15 min, 65°C) wurde die Reaktion beendet. Danach wurde die alkalische Phosphatase durch Phenol-Extraktion entfernt.

2.2.1.8 Auffüllen von zurückliegenden 3'-Enden

DNA (1 µg) wurde mit 1U DNA-Polymerase-1 (Klenow-Fragment) und den vier dNTPs in Klenow-Puffer bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Die Konzentration der dNTPs betrug 0,25 mM.

2.2.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA

pENTR™Vektor-DNA (50 ng) wurde mit dreifach molarem Überschuss an DNA-Fragment gefällt. Das DNA-Pellet wurde in 8 µl Aqua bidest und 1 µl 10xLigase-Puffer gelöst. Die Ligation wurde anschließend mit 1 µl T4-Ligase (400 U/µl) bei Raumtemperatur über Nacht durchgeführt. Dieser Ligationsansatz diente für die Transformation kompetenter Bakterien.

2.2.1.10 Klonierung isolierter DNA-Fragmente

Zur Konstruktion der Eingansvektoren wurde das Vektorplasmid pENTR™1A verwendet. Dieses enthält Polylinker, d.h. DNA-Sequenzen mit definierten

Restriktionsschnittstellen und ein Resistenzgen (Kanamycin). In diese Polylinker-Region konnten nach vorangegangener Restriktion die gewünschten DNA-Fragmente kloniert werden. Nach dieser Ligation wurden die Plasmide in kompetente Bakterien transformiert. Die Bakterien wurden dann auf Agarplatten mit Kanamycin-Zusatz ausgestrichen, so dass sich nur solche Bakterien vermehren konnten, die das Resistenzgen aus dem Plasmid exprimierten. Aus den Einzelkolonien wurden über Nacht bei 37°C Minikulturen hergestellt, aus denen dann die Plasmid-DNA isoliert wurde. Diese wurde durch Restriktionsanalyse auf Integration des gewünschten DNA-Fragments getestet. Die positiven Klone wurden zur Gewinnung größerer Mengen DNA durch eine Maxi-Präparation vermehrt.

2.2.1.11 Minipräparation von Plasmid-DNA

In einer Übernacht-Kultur wurde eine einzelne Bakterienkolonie in drei ml LB-Medium mit Kanamycin vermehrt. Von dieser Bakterienkultur wurden 2 ml zentrifugiert (13.000 Upm, 2 min). Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet wurde in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 und einer kurzen Inkubation wurden die Nukleinsäuren mit 150 µl Lösung 3 präzipitiert. Danach wurde die DNA mit 200 µl Phenol/Chloroform (1:1, v/v) extrahiert. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 5 min) wurde der Überstand mit der Plasmid-DNA mit einem Milliliter Ethanol (99%) gemischt. Die DNA wurde bei 4°C gefällt (20 min Zentrifugation, 13.000 Upm) und das DNA-Pellet anschließend mit Ethanol (70%, v/v) gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE gelöst.

<u>Lösung 1:</u>	Glukose	50 mM
	EDTA, pH8	10 mM
	Tris-HCl, pH 8	25 mM

<u>Lösung 2:</u>	NaOH	0,1 M
	SDS	1 % (wt/vol)

<u>Lösung 3:</u>	5 M Kaliumacetat	60 ml
	Eisessig	11,5 ml
	H ₂ O dest.	28,5 ml

2.2.1.12 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Maxi-Präparation von DNA wurde mit einem Plasmid-Maxi-Kit (Qiagen) gemäß Anleitung durchgeführt. Dazu wurde zunächst die gewünschte Bakterieneinzelkolonie in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin/Kanamycin über Nacht vermehrt. Am nächsten Tag wurde die Suspension zentrifugiert (3300 Upm, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und zu dem Pellet wurden 4 ml Puffer P1 zugegeben. Dann wurden 4 ml Puffer P2 zugegeben, mehrfach geschwenkt und die Suspension für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml gekühltem Puffer P3 wurde die Suspension wieder geschwenkt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem darauf folgenden Zentrifugationsschritt (4°C, 12000 Upm, 30 min) wurde der Überstand in die vorher mit 4 ml QBT Puffer gespülte Qiagen-Säule überführt. Dann wurde die Säule zweimal mit 10 ml QC Puffer gespült und schließlich wurde die DNA mit 5 ml QF Puffer aus der Säule ausgespült. Um die DNA zu fällen wurden 3,5 ml Isopropanol zugeben, die Lösung gemischt und bei 4°C zentrifugiert (12000 Upm, 30 min). Danach wurde das Pellet mit 2 ml Ethanol (70%) bei 4°C gewaschen und zentrifugiert (12000 Upm, 10 min). Nach etwa 20 Minuten Trocknungszeit wurde das Pellet in 500 µl TE gelöst.

<u>Puffer P1 (Resuspensionslösung):</u>	Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
<u>Puffer P2 (Lysispuffer):</u>	NaOH	200 mM
	SDS	1% (wt/vol)
<u>Puffer P3 (Neutralisationslösung):</u>	KCl, pH 5,5	3 M
<u>QBT Puffer:</u>	Zusammensetzung ist Firmengeheimnis	
<u>QC Puffer (Waschlösung):</u>	NaCl	1 M
	MOPS, pH 7,0	50 mM
	Isopropanol	15% (vol/vol)
<u>QF Puffer:</u>	Zusammensetzung ist Firmengeheimnis	

2.2.1.13 Klonasereaktion

Die Klonasereaktion wurde entsprechend der Herstellerinformation durchgeführt. Die dabei zugrunde liegende Gateway®Technologie ist eine Klonierungsmethode, die sich die Site-spezifische Rekombinationsmöglichkeit des Bakteriophagen Lambda zunutze macht (Landy, 1989). Dazu wurden zwei aufeinander abgestimmte Plasmide, der Transportvektor pENTR1A-Sequenz-X (mit einklonierter Expressionssequenz von YB-1 oder GFP) und der Zielvektor pAd/CMV/V5-Dest™ genutzt.

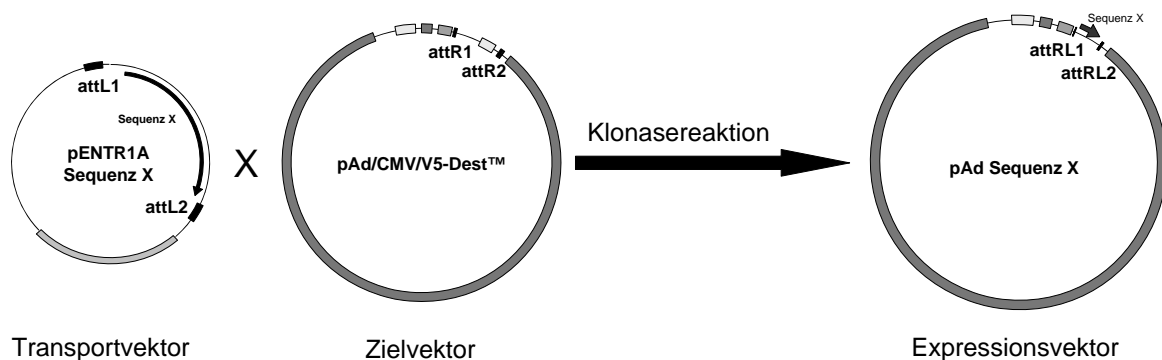


Abbildung 2.2: Schema der Klonasereaktion

Wie in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt, werden die Vektoren bei der Klonasereaktion an den spezifischen Sites attL1 und 2, beziehungsweise attR1 und 2 geschnitten und direkt neu kombiniert (attRL1 und 2). Dadurch kommt es zur Integration der gewünschten Sequenz X in den Zielvektor. Der genutzte Klonasemix besteht unter anderem aus den rekombinanten Proteinen Integrase und Excisionase des Bakteriophagen Lambda und dem Escherichia coli codierten Protein IHF (Integration Host Factor) sowie verschiedenen Puffern.

In einem Reaktionsgefäß wurden 100 ng pENTR1A-YB-1/GFP und 150 ng pAd/CMV/V5-Dest™ in 8 µl TE vorgelegt. Nachdem der Klonasemix aufgetaut und vorsichtig geschüttelt war, wurden 2 µl in das Reaktionsgefäß gegeben und dieses für eine Stunde bei 25°C inkubiert. Danach wurde 1 µl Proteinase K zugegeben und das Reaktionsgefäß für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Die erhaltenen Plasmide wurden in One Shot® OmniMAX™2T1 Phage-Resistant Cells (Invitrogen) transformiert. Dazu wurde ein Reaktionsgefäß mit den

kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, der Reaktionsansatz zugegeben und vorsichtig mit den Zellen durchmischt. Danach folgte eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten und eine Hitzeschockbehandlung für 30 Sekunden bei 42°C. Nachdem die Zellen wieder auf Eis für zwei Minuten abgekühlt waren, wurden 250 µl vorgewärmtes S.O.C Medium zugegeben und die Reaktionsgefäße wurden leicht schüttelnd (225 U/min) bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Der Mix wurde mit LB Medium 1:50 verdünnt und 50 µl davon auf Selektivnährböden (Ampicillin) ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C konnten die Kolonien weiter vermehrt werden.

2.2.1.14 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurden jeweils 1 mg Plasmid DNA zu QIAGEN Genomic Services, Sequencing Services (Hilden) geschickt.

Primer für die Sequenzierung (5'-3'):

T7-Promotor

TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

V5 C-term reverse

ACC GAG GAG AGG GTT AGG GAT

2.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit Hilfe der PCR kann man in vitro ganz gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, vervielfältigen. Als Starthilfe für die PCR sind Primer notwendig. Diese kurzen, einzelsträngigen DNA-Moleküle sind zu einem spezifischen Abschnitt einer definierten Sequenz, der DNA-Matrize (Template) komplementär. Damit die DNA-Matrize einzelsträngig vorliegt, wird diese zunächst durch hohe Temperatur denaturiert. Dann kommt es bei einer für jeden Primer unterschiedlichen Temperatur zur Anlagerung der Primer (Annealing) an die komplementären Sequenzabschnitte. Anschließend verlängert eine hitzestabile DNA-Polymerase bei 72°C und in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der denaturierten DNA-Matrize in 5'3'Richtung (Elongation). So werden neue DNA-Stränge mit zur Matrize komplementärer Sequenz erzeugt, die in den folgenden Zyklen auch wieder als Matrize dienen. Die DNA liegt am Ende eines Zyklus doppelsträngig vor.

<u>Reaktionsansatz für 10 Proben:</u>	Primer 1, 40 ng/μl	25 μl
	Primer 2, 40 ng/μl	25 μl
	Taq-Polymerase, 5 U/μl	2 μl
	Wasser	303 μl
	MgCl ₂ , 50 mM	25 μl
	dNTPs, 2,5 mM	50 μl
	10 x Puffer	50 μl

<u>Primer (5'-3'):</u>	YB-1 380 forward:	GTC CTG GTG GTG TTC CAG TT
	YB-1 821 reverse:	TGA CCT TGG GTC TCA TCT CC
	GFP 284 forward:	TTC TTC TGC TTG TCG GCC AT
	GFP 580 reverse:	GTG ACC ACC CTG ACC TAC GG

Es wurden 48 μl dieses Reaktionsansatzes mit 2 μl in TE gelöster genomischer DNA gemischt. In einem DNA Thermal Cycler 480 wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion mit folgenden Parametern durchgeführt:

Start	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	30 sec
Annealing	60°C	30 sec
Elongation	72°C	45 sec
Ende	72 °C	10 min

Nach 34 Zyklen wurde die Temperatur auf 4°C gesenkt. Anschließend wurden die Reaktionsansätze auf einem 2%igen Agarose-Gel aufgetrennt.

2.2.3 Kompetente Zellen

2.2.3.1 Herstellung kompetenter Zellen

LB-Medium (drei Milliliter) wurde mit einer Kolonie XL1-Blue unter sterilen Bedingungen in einem Erlenmeyerkolben angeimpft und acht Stunden bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Diese Kultur wurde anschließend auf 100 ml LB-Medium überimpft und ein bis zwei Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden bei 4000 Upm fünf Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml kaltem TFB1-

Medium resuspendiert und 90 Minuten auf Eis gestellt. Es wurde wieder fünf Minuten bei 4000 Upm zentrifugiert und das Pellet in vier Milliliter TFB2-Medium resuspendiert und jeweils 100 µl in Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C eingefroren.

<u>TFB1:</u>	RbCl	100 mM
	MnCl ₂	50 mM
	KAc	30 mM
	CaCl ₂	10 mM
	Glycerin, pH 8,0	15% (vol/vol)
<u>TFB2:</u>	MOPS	10 mM
	RbCl	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	Glycerin, pH 8,0	15% (vol/vol)

2.2.3.2 Transformation kompetenter Zellen

Die bei -80°C aufbewahrten kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 100 µl dieser kompetenten Zellen wurden mit 5 µl Ligationsansatz (~100 ng) vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Hitzeschock (90 Sekunden bei 42 °C und einminütigem Abkühlen auf Eis) wurden die Bakterien eine halbe Stunde in 300 µl Antibiotika-freiem LB-Medium bei 37 °C geschüttelt. Hiervon wurden 300 µl und 30 µl auf zwei LB-Agarplatten (mit 100 pg/ml Kanamycin für pENTR™1A) ausplattiert. Einzelne Bakterienkolonien wurden nach 12 bis 18 Stunden Inkubation weiter in größeren Kulturansätzen vermehrt und danach zur Isolierung von Plasmid-DNA verwendet.

2.2.4 Vermehrung der HEK-Zellen

Die bei -80°C aufbewahrten 293A HEK-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in 15 ml Arbeitsmedium resuspendiert. Dann wurde bei 900 Upm für 3 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 10 ml Medium aufgenommen und nach Vorlage von je 18 ml Arbeitsmedium auf fünf Zellkulturschalen aufgeteilt. Diese

Schalen wurden für 2-5 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert bis unter dem Mikroskop ein geschlossener Zellrasen zu sehen war. Dann wurde das Arbeitsmedium abgesaugt und die Platten zweimal mit 15 ml EDTA Lösung gewaschen. Danach wurden je 3 ml Trypsin zugegeben und die Platten bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert, bis sich unter dem Mikroskop ein deutliches Ablösen der Zellen zeigte. Diese Trypsinisierung wurde durch Zugabe von je 20 ml Arbeitslösung und anschließendem Zentrifugieren (900 Upm, 3 min) abgestoppt. Die so entstandenen Pellets wurden nun entweder, wie oben beschrieben weiter vermehrt oder für spätere Transfektionen in 1,5 ml Gefriermedium aufgenommen und bei -80°C eingefroren.

2.2.5 Transfektion

Die Arbeit mit den Viren wurde in einem S2 Labor unter einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt.

Einen Tag vor der Transfektion wurden $0,5 \times 10^5$ HEK-Zellen / ml HEK-Arbeitsmedium ohne Antibiotikazusatz in 6-Well Schalen à 2 ml ausplattiert. Am Tag der Transfektion wurden 4 µg der PacI geschnittenen Virusvorstufe in 250 µl OptiProSFM gelöst und vorsichtig gemischt. Lipofectamin wurde vorsichtig durchmischt, dann wurden 3 µl in 250 µl OptiPro SFM gelöst und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die DNA Lösung und die Lipofectaminlösung gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Mischung zu einem Well HEK-Zellen dazugegeben, vorsichtig gemischt und die Zellen bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das antibiotikafreie Medium durch normales HEK Arbeitsmedium ersetzt (siehe 2.1.3). Nach etwa 10 Tagen zeigten die Zellen bedingt durch die Virusinfektion eine nahezu vollständige Ablösung von der Kulturschale und wurden weiter verarbeitet.

2.2.6 Anzucht der Viren auf HEK-Zellen

Das Medium mit den abgelösten HEK-Zellen wurde zentrifugiert (900 Upm, 5 min) und der Überstand wurde entsorgt. Die Zellpellets wurden in sterilem PBS aufgenommen (1 ml PBS pro Zellpellet aus 20 ml HEK Arbeitsmedium) und abwechselnd für jeweils 5 Minuten in flüssigen Stickstoff oder in 37°C warmes Wasser getaucht. Dadurch wird die Zellwand der HEK-Zellen zerstört und die Viren

werden freigesetzt. Nach vier solcher Zyklen wurde die Lösung gut durchmischt und danach zentrifugiert (12000 Upm, 10 min). Der Überstand wurde abgenommen und zur Infektion weiterer HEK-Zellen genutzt. Nach mehreren Viruspassagen wurde der Titer bestimmt und eingestellt. Danach erfolgte eine Neuinfektion mit 5×10^8 Viren je 20 ml Schale HEK-Zellen.

2.2.7 Titerbestimmung der Viren

Die Titerbestimmung erfolgte nach der für 24-Well Schalen modifizierten Gebrauchsanweisung. In einer 24-Well Schale wurde je Well 1 ml HEK-Zellen mit einer Konzentration von 3×10^5 /ml Medium ausplattiert. Dann wurde mit PBS eine zehnfach Verdünnungsreihe des zu bestimmenden Virus hergestellt. Pro Well wurden 100 μ l Virusverdünnung zugegeben, die Belegung der einzelnen Wells ist in Abbildung 2.3 zu sehen.

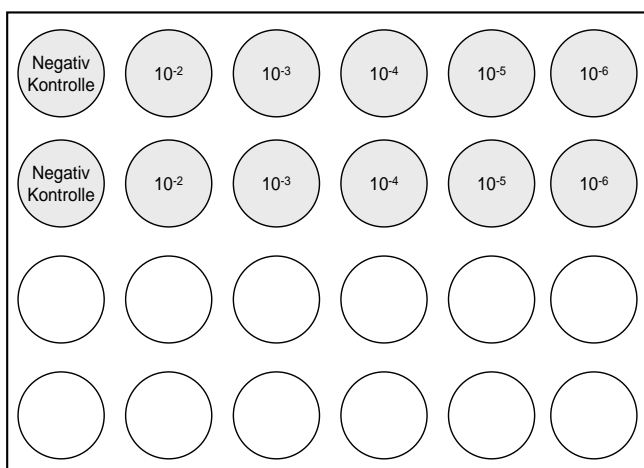


Abbildung 2.3: Pipettierschema zur Titerbestimmung des Virus

Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ wurde das Medium abgesaugt und die Schalen wurden für fünf Minuten luftgetrocknet. Dann wurden pro Well vorsichtig 500 μ l eiskaltes Methanol zugegeben und die Schalen für 10 Minuten bei -20°C eingefroren. Danach wurde das Methanol abgesaugt und die Schalen wurden dreimal mit PBS + 1% BSA gewaschen. Ein Virus spezifischer Maus-anti-Hexon-Antikörper wurde 1:1000 in PBS+1% BSA gelöst und es wurden je Well 250 μ l dieser Lösung zugegeben und die Platte für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Erstantikörper abgesaugt und die Schalen wurden dreimal mit PBS +

1% BSA gewaschen. Ratte-anti-Maus-Antikörper wurde 1:500 in PBS + 1% BSA gelöst und es wurden je Well 250 µl dieser Lösung zugegeben und die Platte für eine Stunde bei 37°C leicht schüttelnd inkubiert. Jetzt wurde der Zweitantikörper abgesaugt und die Schalen wurden dreimal mit PBS + 1% BSA gewaschen. Je Well wurden 250 µl DAB Arbeitslösung zugegeben (10x DAB Konzentrat und 1x Peroxidase Puffer im Verhältnis 1:10). Nach 10 Minuten wurde die Arbeitslösung abgesaugt, die Zellen mit PBS überschichtet und die virusinfizierten (jetzt schwarz gefärbten) Zellen im Durchlichtmikroskop betrachtet (siehe Abbildung 2.4). Es wurden in der höchsten und zweithöchsten Verdünnung fünf Gesichtsfelder je Ansatz ausgezählt und der Titer als Mittelwert daraus bestimmt.

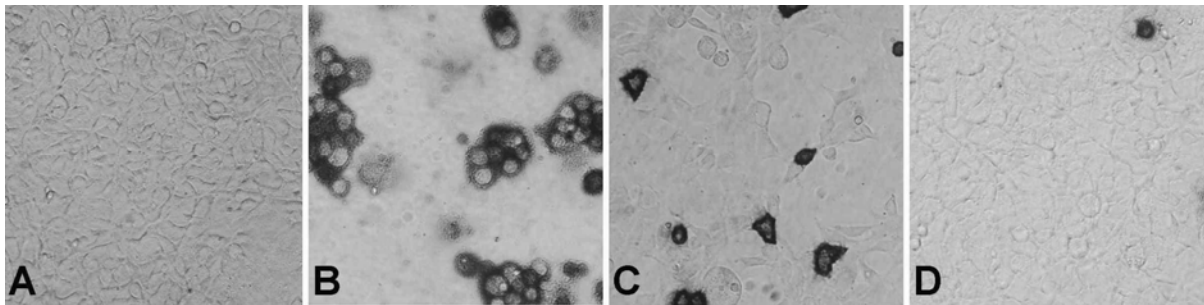


Abbildung 2.4: Durchlichtbilder (200x) der schwarz angefärbten virusinfizierten Zellen bei unterschiedlicher Verdünnung des Virus. (A) Negativkontrolle (B) 10^{-2} Verdünnung, die Zellen sind alle infiziert, ein Großteil ist aber schon abgelöst und deshalb nicht mehr zu sehen. In dieser Verdünnungsstufe kann der Virustiter nicht bestimmt werden. (C) 10^{-5} Verdünnung, (D) 10^{-6} Verdünnung. Die Gesichtsfelder C und D wurden ausgezählt und daraus der Virustiter bestimmt.

Der Virustiter (ifu/ml) errechnet sich wie folgt.

$$\text{ifu/ml} = \frac{\text{Infizierte Zellen/Feld} \times \text{Felder/Schale}}{\text{Virusvolumen} \times \text{Verdünnung}}$$

Vereinfacht für eine 24-well Schale ergibt sich daraus:

$$\text{ifu/ml} = \frac{\text{Infizierte Zellen/Feld} \times 64}{0,1 \times \text{Verdünnung}}$$

2.3 Isolierung und Zellkultur von ventrikulären Kardiomyozyten

2.3.1 Versuchstiere

Die Kardiomyozyten wurden aus 3-4 Monate alten männlichen Wistar-Ratten isoliert. Die ausgewachsenen Ratten waren 200-340 g schwer und stammten aus eigener Zucht des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen. Sie wurden im institutseigenen Tierstall aufgezogen und hatten freien Zugang zu Nahrung (Standardfutter: Altromin®) und Wasser.

2.3.2 Präparation ventrikulärer Kardiomyozyten aus Rattenherzen

Die Präparation und Kultur der Kardiomyozyten erfolgte nach der Methode von Schlüter und Schreiber (2005). Vor Beginn der Präparation wurde die Langendorff-Perfusionsanlage mit Powellmedium gespült und luftblasenfrei mit 80 ml Powellmedium (30°C) gefüllt. Während der Zellisolation wurde das Powellmedium mit Carbogen begast, um den pH Wert konstant zu halten.

Zunächst wurden die Ratten für 1-2 min in Diethylether betäubt, die Tötung geschah durch Überstreckung des Rückenmarks. Dann wurde der Thorax eröffnet, das Zwerchfell durchtrennt und die Lunge zusammen mit dem Herzen entnommen und in eine bereitstehende Petrischale mit 0,9%iger Kochsalzlösung überführt.

In der Petrischale wurde das dem Herzen anhängende Lungen- und Mediastinalgewebe entfernt und die Aorta ascendens freipräpariert. Danach wurde das Herz mit der Aorta an die Perfusionsspitze der Langendorff-Apparatur angehängt. Es wurde mit 40 ml Powellmedium blutfrei gespült und dann retrograd mit 50 ml Kollagenasepuffer für 25 min perfundiert (ca. 1 Tropfen/s). Danach wurde das Herz von der Langendorff-Apparatur abgenommen und die Vorhöfe und die Aorta entfernt. Mit einem Gewebehacker wurde das Ventrikelgewebe bei einer Schnittbreite von 0,7 mm mechanisch zerkleinert. Der so entstandene Gewebebrei wurde anschließend für 5 min bei 37°C in 30 ml Carbogen-begastem Kollagenasepuffer nachverdaut. Währenddessen wurde mehrmals vorsichtig auf- und abpipettiert, um die Auftrennung in Einzelzellen zu unterstützen. Die Suspension wurde danach durch ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 200 µm filtriert und zentrifugiert (3 min; 400 U/min). Den Zellen wurden nach dem Absaugen des kollagenasehaltigen

Überstands 10 ml Perfusionspuffer mit 200 μM Ca^{2+} -Gehalt zugegeben, um damit eine langsame Gewöhnung der Herzmuskelzellen an Kalzium einzuleiten. Nach weiteren zwei Minuten Zentrifugation bei 400 U/min wurde das Pellet in Perfusionspuffer mit 400 μM CaCl_2 aufgenommen und zu einer homogenen Suspension aufgeschüttelt. Diese wurde in Reagenzgläser überführt. Die Reagenzgläser wurden zuvor mit einer ca. 10 cm hohen Flüssigkeitssäule (1000 μM CaCl_2 -Perfusionspuffer) befüllt. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert (300 U/min; 1 min). Damit wurde eine Herzmuskelzellpopulation isoliert, die zu 40-60 % aus intakten, stäbchenförmigen Zellen bestand.

2.3.3 Vorinkubation der Kulturschalen für die Kardiomyozyten

Um ein maximales Anheften der Kardiomyozyten an die Kulturschalen zu erreichen, wurden die Kulturschalen mit Vorplattiermedium beschichtet und für mindestens 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Vorplattiermedium wurde unmittelbar vor dem Ausplattieren der Zellen abgesaugt.

2.3.4 Ausplattieren der Kardiomyozyten

Die isolierten Kardiomyozyten wurden in Ausplattiermedium aufgenommen, vorsichtig zu einer homogenen Suspension gemischt und auf die vorbereiteten Kulturschalen ausplattiert.

2.3.5 Kultivierung der Kardiomyozyten

Die ausplattierten Zellen wurden für ein bis zwei Stunden bei 37°C unter CO_2 -freien Bedingungen inkubiert und anschließend zweimal mit CCT-Kulturmedium mit Gentamycin (10 $\mu\text{g/ml}$) gewaschen. Dadurch wurden nicht angeheftete Zellen entfernt. Auf Schalen Typ Falcon 3001 wurde je ein Milliliter, auf Schalen Typ Falcon 3004 je zwei Milliliter Medium als Endvolumen gegeben.

Der Anteil von lebenden, intakten und stäbchenförmigen Zellen lag nach dem Waschvorgang bei 90%. Diese wurden nun zu nachfolgenden Versuchen verwendet.

2.3.6 Behandlung der Kardiomyozyten

Nach zweimaligem Waschen der Kardiomyozyten mit CCT-Kulturmedium (vgl. 3.2.3) wurden diese nach einer ca. zehnminütigen Ruhepause entsprechend der jeweiligen Versuchsvorschriften mit Virus infiziert und weiter behandelt. Als Kontrollen dienten

unbehandelte Zellen aus derselben Präparation. Anschließend wurden die behandelten Schalen bzw. die Kontrollschalen im Brutschrank (37°C, ca. 95 % Luftfeuchte) unter normoxen Bedingungen inkubiert.

2.4 Nachweis von RNA

2.4.1 Isolierung von Gesamt RNA

Die Herzmuskelzellen der einzelnen Versuchsansätze wurden mit einem Zellschaber abgeschabt und mit dem Medium in Falcon 50 ml-Röhrchen überführt. Darin wurden sie für drei Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet wurde in einem Milliliter PBS gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (3 min; 3000 Upm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in einem Milliliter PBS gelöst. Nach einer weiteren Zentrifugation (3 min; 2000 Upm) wurden 500 µl Trizol zum Pellet zugegeben und dieses mit einem Pistill zerkleinert, dann wurden weitere 500µl Trizol zugegeben und das Reaktionsgefäß für fünf Minuten auf Eis geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben, das Reaktionsgefäß geschwenkt und zentrifugiert (15 min; 12000 Upm, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, mit 500 µl Isopropanol gemischt und wieder zentrifugiert (30 min, 12000 Upm, 4°C). Danach wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in einem Milliliter Ethanol (80%) für zehn Minuten auf Eis gewaschen. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (15 min; 12000 Upm, 4°C) wurde das Pellet getrocknet, in 18 µl DEPC-Wasser aufgenommen und 15 min auf Eis darin gelöst.

2.4.2 DNase-Behandlung

Um sicherzustellen, dass keine DNA mehr vorhanden war, wurde anschließend ein DNase-Verdau durchgeführt. Es wurden zur gelösten RNA 2,2 µl DNase Puffer, 1 µl DNase und 1 µl RNAsin zugegeben und das Reaktionsgefäß für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 450 µl DEPC Wasser und 500 µl Phenol/Chloroform (1/1; vol/vol) wurde der Ansatz gemischt und zentrifugiert (15 min; 12000 Upm, 4°C). Der Überstand wurde mit 550 µl Isopropanol und 50 µl Natriumacetat gemischt und die RNA bei -20°C für eine Stunde präzipitiert. Nach Zentrifugation (13000 Upm, 15 min) wurde das RNA-Pellet anschließend mit Ethanol (80%) zehn Minuten auf Eis

gewaschen. Danach kam ein weiterer Zentrifugationsschritt (15 min; 12000 Upm, 4°C) und dann wurde das Pellet getrocknet und in 10 µl DEPC Wasser aufgenommen.

2.4.3 Bestimmung der RNA Konzentration

Die RNA Konzentration wurde photometrisch mit dem NanoDrop ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer bestimmt. Dieses Gerät misst im Wellenlängenbereich von 120-750 nm und benötigt zur Konzentrationsbestimmung ein Probenvolumen von 1,5 µl. Vor Beginn der Messung wurde das Gerät mit Aqua bidest. kalibriert. Dann wurde das Probenvolumen auf den Sensor aufgetragen und die Messung gestartet. Das Gerät gibt eine Messkurve aus und berechnet selbstständig die RNA Konzentration in µg/µl.

2.4.4 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird aus einem RNA-Strang ein komplementärer DNA-Strang hergestellt. Es wurde je Versuchsansatz 1 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 5 µl DEPC Wasser aufgenommen, zehn Minuten auf 65°C erhitzt und sofort danach auf Eis abgekühlt. Dann wurden 5 µl des Reaktionsmix zugegeben und die Reaktionsgefäße für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Proteindegradation wurde das Gemisch für zehn Minuten auf 95°C erhitzt.

<u>Reaktionsmix für 10 Ansätze:</u>	5xRT-Puffer	20 µl
	DNTP (40 mM)	10 µl
	Oligo dT (5,5 µM)	10 µl
	DTT(100 mM)	5 µl
	RNAse-Inhibitor	2 µl
	MMLV RT (200 Units/µl)	3 µl

2.4.5 Realtime-PCR

Bei der hier verwendeten Realtime-PCR wird der Proben-DNA ausser den spezifischen Primern und Puffern noch der Cyaninfarbstoff SYBR®green zugegeben. Dieser Farbstoff fluoresziert, wenn er sich in doppelsträngige DNA einlagert. Bei der

Realtime-PCR werden am Ende eines jeden Zyklus die Fluoreszenz und damit auch die Zunahme der doppelsträngigen DNA gemessen. Da der Farbstoff sich in jede doppelsträngige DNA einlagert, ist eine genauere Differenzierung zwischen den gewünschten Produkten und unspezifisch entstandenen anderen Produkten notwendig. Dies geschieht mit Hilfe einer so genannten Schmelzkurve (siehe Abbildung 2.5). Dazu wurde am Ende der PCR die Proben temperatur schrittweise um 1°C bis auf 90°C erhöht, und die Fluoreszenz nach jeder Temperaturerhöhung gemessen. Die amplifizierte doppelsträngige DNA denaturiert bei einer spezifischen Temperatur (Schmelztemperatur) und setzt mit einem Mal den gesamten Fluoreszenzfarbstoff frei, was zu einem starken Abfall des Fluoreszenzsignals führt. Da die Schmelztemperatur von der Basenzusammensetzung und der Produktlänge abhängig ist, konnten Primerdimere und unspezifische Produkte gut von dem spezifischen Produkt abgegrenzt werden.

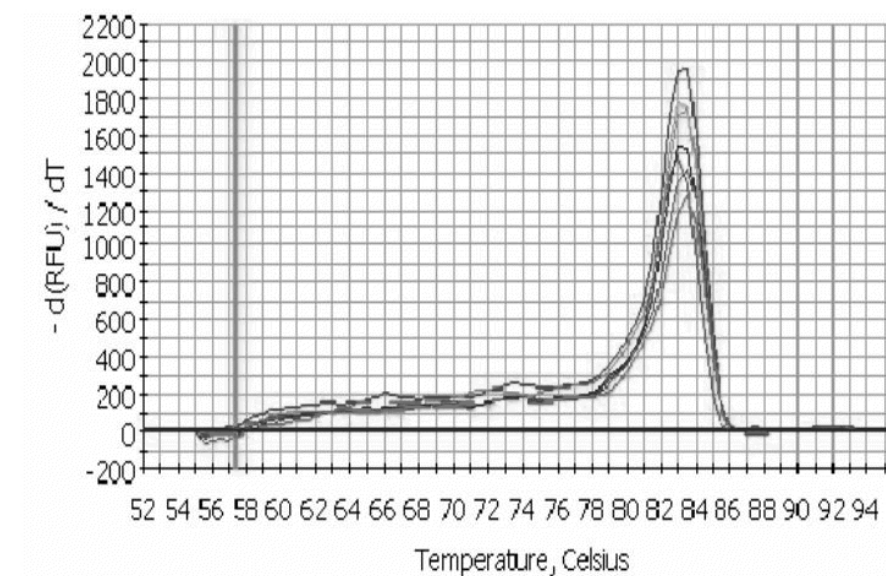


Abbildung 2.5: Schmelzkurve von sechs verschiedenen Proben, bei denen in der PCR immer dasselbe Produkt gebildet wurde. Der Peak signalisiert den Fluoreszenzabfall und liegt bei allen Proben bei 83°C.

Um sicherzustellen, dass die amplifizierten Produkte auch die erwartete Größe aufwiesen, wurde zusätzlich zur Schmelzkurve noch die Größe der entstandenen Produkte auf einem DNA-Gel überprüft. Dazu wurden bei jeder PCR von mehreren Probenansätzen jeweils 10 µl mit $1/10$ Volumen DNA-Lade-Puffer versetzt und in die

Geltaschen eingefüllt. In eine Geltasche wurde ein Marker eingefüllt. Dann wurde die Elektrophorese bei 80-140 V ca. 30 min. durchgeführt.

2.4.5.1 Verwendete Primer in der Realtime-PCR

Name	Forward Sequenz (5'-3')	Reverse Sequenz (5'-3')	Annealing Temperatur
YB-1	TTC GCA GTG TAG GAG ATG GA	CTA CGA CGT GGA TAG CGT CT	60°C
HPRT	CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT	CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC	63°C
SMAD 7	AGA GGC TGT GTT GCT GTG	CAT CGG GTA TCT GGA GTA AGG	60,8°C

2.4.5.2 PCR-Ansatz

Die hergestellte cDNA (siehe 3.4.1.2) wurde in einer 1:10 Verdünnung in der Realtime-PCR eingesetzt. Von den einzelnen Proben wurde je eine Doppelbestimmung durchgeführt. Dazu wurden je zweimal 2 µl cDNA mit 18 µl PCR-Mix versehen .

<u>PCR-Mix für 10 Ansätze:</u>	SYBR Green Supermix	100 µl
	Primer F (40 ng/µl)	6 µl
	Primer R (40 ng/µl)	6 µl
	DEPC Wasser	68 µl

2.4.5.3 Laufprogramme der Realtime-PCR

Es wurde ein Realtime-Thermocycler der Firma Bio-Rad mit dem Programm Icyler verwendet. Die Programmierung wurde hinsichtlich der spezifischen Annealingtemperatur des jeweilig verwendeten Primers angepasst. Die Zyklenanzahl von Zyklus 2 wurde nicht verändert, da eventuelle unerwünschte unspezifische PCR Produkte und Primerdimere in der abschließenden Schmelzkurve und auf dem DNA-Gel identifiziert werden konnten.

Zyklus 1 (1x)	95°C für 3 min
Zyklus 2 (45x)	95°C für 30 sec (Denaturierung) ~60°C für 30 sec (Annealing) 72°C für 30 sec (Amplifikation)
Zyklus 3 (1x)	72°C für 10 min
Zyklus 4 (50x)	50°C (+1°C) für 10 sec (Schmelzkurve)

2.4.5.4 Auswertung der PCR

Die Auswertung der PCR erfolgte als relative Quantifizierung nach der Methode von Pfaffl (2001). Bei dieser Methode wird der Ct-Wert des Zielgens in Beziehung zum Ct-Wert eines Housekeeping-Gens gesetzt, wodurch sich quantitative Aussagen treffen lassen. Ein Housekeeping-Gen muss in ausreichender Menge in den untersuchten Zellen vorliegen und es darf unter den verschiedenen Versuchsbedingungen nicht mitreguliert werden. Als solches diente hier HPRT.

Bei einer angestrebten Effektivität von 100 % eines Primers, sowie einer maximalen Sensitivität und Spezifität verdoppelt sich die Menge der Amplifikate in jedem Zyklus der PCR. Zu Beginn der Reaktion sind noch sehr wenige Produkte und dementsprechend auch nur wenig doppelsträngige DNA vorhanden. Das geringe Fluoreszenzsignal kann nicht vom Hintergrund unterschieden werden und überschreitet den Schwellenwert (threshold) noch nicht. Erst nach einigen Amplifikationsschritten ist die DNA-Konzentration hoch genug, damit ein entstehendes Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Die Höhe des Schwellenwertes wird so festgelegt, dass der Schnittpunkt der Kurve aller Proben mit dem Threshold (Ct-Wert) möglichst im Bereich des beginnenden exponentiellen Anstiegs der Kurven liegt (siehe Abbildung 2.6).

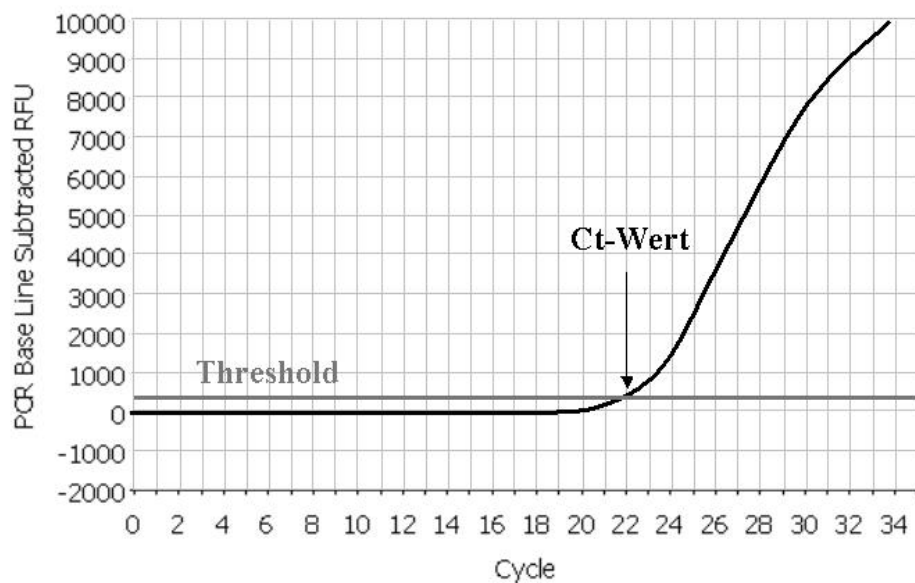


Abbildung 2.6: Fluoreszenzverlauf einer Probe während der RT-PCR (schwarz). Der gesetzte Schwellenwert (threshold) ist dunkelgrau dargestellt. Der Schnittpunkt beider Funktionen ist der so genannte Ct Wert.

Da für jede Probe Doppelbestimmungen durchgeführt wurden, wurde von den erhaltenen Ct Werten zunächst jeweils der Mittelwert bestimmt. Dieser Mittelwert wurde dann direkt in Beziehung zu dem Mittelwert der Ct Werte des Housekeeping-Gens HPRT gesetzt. Die Relative Expression eines Zielgens wird beschrieben durch eine Exponentialfunktion zur Basis Zwei mit dem Exponenten $-\Delta Ct$.

$$\Delta Ct (\text{Zielgen}) = Ct (\text{Zielgen}) - Ct (\text{Housekeeping-Gen})$$

$$\text{Relative Expression (Zielgen)} = 2^{-\Delta Ct (\text{Zielgen})}$$

2.5 Proteinnachweis

2.5.1 Isolierung von Gesamtprotein

Zur Isolierung von Gesamtprotein wurden die Herzmuskelzellen nach entsprechender Infektionszeit zunächst zweimalig mit kalter PBS-Lösung gewaschen. Nach Absaugen der PBS-Lösung wurden je 2 ml Schale 125 μ l Ripa-Puffer zugegeben, dann wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und mit Ripa-Puffer in ein Reaktionsgefäß überführt. Darin wurden sie auf Eis für 30 min inkubiert. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt für 30 min, bei 12000 Upm und 4°C. Das entstandene Pellet wurde verworfen.

2.5.2 Proteinmengenbestimmung

Zur Bestimmung der in den einzelnen Proben enthaltenen Proteinmenge wurde ein Lowry Assay durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine Standardverdünnungsreihe von BSA in Wasser hergestellt (0; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/ml). Von der Standardreihe wurden jeweils 10 μ l mit 50 μ l Ripa-Puffer gemischt und von den Proben wurden jeweils 10 μ l mit 50 μ l Wasser gemischt. Dann wurden je Ansatz 50 μ l NaOH (0,5 M) und 500 μ l Reagenz A zugegeben. Die Ansätze wurden für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurden 100 μ l Folinciocalteusches Phenolreagenz (Merck 9001; 22,73 ml Originalreagenz/ 1l Millipore Wasser) zugegeben. Danach folgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min und eine Zentrifugation für 30 min bei 13000 Upm. Von den Überständen der Standardreihe und der Proben wurden je 200 μ l auf eine 96-Well-Platte aufgetragen und im

Mikrotiterplatten-Photometer bei 578 nm photometrisch bestimmt. Danach wurde mit Hilfe der Standardreihe eine Standardgerade ermittelt und damit die einzelnen Proteinkonzentrationen errechnet.

<u>Reagenz A:</u>	Na-K-Tatrat 3,3% (wt/vol)	200 µl
	CuSO ₄ 1,25% (wt/vol)	200 µl
	Na ₂ CO ₃ 2,5% (wt/vol)	19,6 ml

2.5.3 Lämmli-Färbung

Nachdem die Proteinkonzentrationen der einzelnen Ansätze bestimmt waren, wurden die Proben auf dieselbe Konzentration eingestellt. Dann wurden 45 µl der Versuchsansätze mit 15 µl 4x Lämmli Puffer und 1,8 µl DTT gemischt und bei 95°C für 10 min aufgekocht und danach sofort wieder auf Eis abgekühlt.

SDS ist ein Detergens und es löst das Proteingemisch, indem es fast alle nichtkovalenten Bindungen in nativen Proteinen zerstört. DTT wird zur Reduktion möglicher Disulfidbrücken zu Sulfhydrylgruppen zugegeben. Die SDS-Anionen binden an die Hauptketten des Proteins, so dass ein Komplex aus SDS und denaturiertem Protein entsteht, dessen stark negative Ladung der Masse des Proteins ungefähr proportional ist.

2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zunächst wurden zwei Glasplatten mit zwei Plastikspacern und einem Gummischlauch dazwischen mit mehreren Klemmen zusammengebaut (siehe Abbildung 2.7). Dann wurde das Trenngel gemischt, vorsichtig zwischen die zwei Glasplatten bis etwa 4 cm unterhalb des oberen Randes eingefüllt und mit einem Milliliter SDS (0,1 %) überschichtet.

<u>Trenngel, 10 %:</u>	Acrylamid, 30 %	6,6 ml
	H ₂ O Millipore	8,4 ml
	Tris, 1,5 M, pH 8,8	5 ml
	SDS, 10 % (wt/vol)	200 µl
	APS, 10 % (wt/vol)	50 µl
	TEMED	40 µl

Nach etwa 30 Minuten war das Trenngel auspolymerisiert. Nun wurde die SDS-Überschichtung entfernt, das Sammelgel gemischt, eingefüllt und sofort luftblasenfrei der Kamm eingesteckt.

<u>Sammelgel:</u>	Acrylamid, 30%	1,675 ml
	H ₂ O Millipore	6,75 ml
	Tris, 1,5 M, pH 6,8	1,25 ml
	SDS, 10 % (wt/vol)	100 µl
	APS, 10 % (wt/vol)	100 µl
	TEMED	20 µl

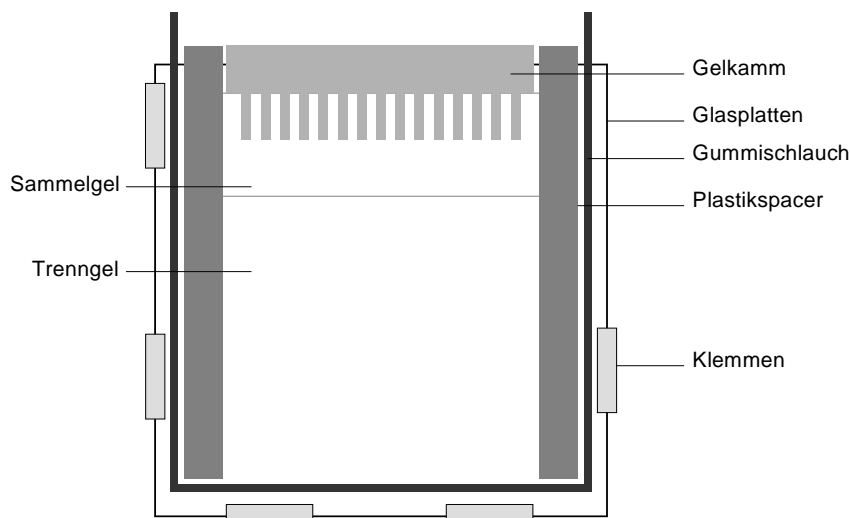


Abbildung 2.7: Zusammenbau der Glasplatten für die SDS-Page

Nachdem das Sammelgel nach 20 Minuten auspolymerisiert war, wurden die Glasplatten mit Gel in die Gel-Elektrophorese-kammer eingebracht und die Kammer mit Lämmli-Laufpuffer befüllt. Dann wurde der Kamm entfernt und mit einer Hamilton Spritze die Proben in die einzelnen Taschen eingefüllt. In die vorletzte Tasche wurde ein Low-Marker eingefüllt, in die letzte Tasche ein Rainbow-Marker. Bei 200 V wurde die Elektrophorese für drei Stunden durchgeführt.

Da die Proteine durch die vorangegangene Lämmli-Färbung alle eine ihrer Größe entsprechende negative Ladung besitzen, werden die einzelnen Proteine aufgrund ihrer relativen Molekülmasse voneinander getrennt. Kleine Moleküle wandern

deutlich schneller im Trenngel als große. Das Sammelgel dient dazu, eine schärfere Bandentrennung zu erzielen. Die Matrix im Sammelgel besitzt größere Poren und einen anderen pH Wert als das Trenngel. Darin wandern die Moleküle schnell und ohne Auftrennung gleichmäßig bis zur Grenzschicht, wo sie stark verlangsamt werden und nun abhängig von der Größe aufgetrennt werden.

<u>Lämmli-Laufpuffer:</u>	Glycerin	14,4g
	Tris	3,03g
	SDS	10 ml
	Millipore Wasser	Ad 1l

2.5.5 Western-Blot

Um die einzelnen Proteine mit Antikörpern nachweisen zu können, müssen die Proteine erst auf eine Membran übertragen werden. Dazu wurde im Anschluss an die SDS-Page ein semi-dry Western-Blot durchgeführt. Zunächst wurden passend geschnittene Filterpapiere in den verschiedenen Kathoden und Anodenpuffern eingeweicht. In der Blot-Kammer wurde das aus den Glasplatten gelöste Trenngel sandwichartig zwischen den Filterpapieren eingeschichtet. Dabei kamen zuerst drei Filterpapiere, die in zehnfachem Anodenpuffer getränkt waren, dann drei Stück, die in einfachem Anodenpuffer getränkt waren, dann die Nitrocellulosemembran, dann das Gel und schließlich drei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere (siehe Abbildung 2.8). Dabei mussten sämtliche Luftblasen sorgfältig entfernt werden. Bei maximal 50 V und 200 mA wurde der Blot für zwei Stunden durchgeführt.

<u>Kathodenpuffer:</u>	Tris; 25 mM	3,03 g
	6-Aminohexansäure ; 40 mM	5,25 g
	Methanol, 20 %; pH 9,4	Ad 1l

<u>1x Anodenpuffer:</u>	Tris; 30 mM	3,63 g
	Methanol, 20 %; pH 10,4	Ad 1l

<u>10x Anodenpuffer:</u>	Tris; 300 mM	36,3 g
	Methanol, 20 %; pH 10,4	Ad 1l

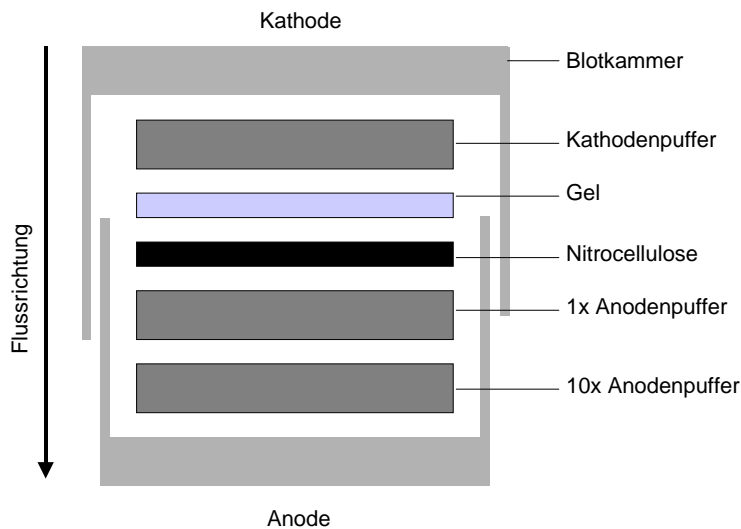


Abbildung 2.8: Schematischer Zusammenbau des semi-dry Blotverfahrens

Danach wurde die Membran entnommen, getrocknet und mit Ponceaurot-S-Lösung gefärbt. Der Farbstoff lagert sich unspezifisch an alle Proteine an und macht die Bandenmuster somit sichtbar. Nachdem die Membran mehrfach mit Millipore-Wasser gewaschen und so der überschüssige Farbstoff entfernt war, wurde sie beschriftet, die Bandenhöhe der Marker wurde markiert und sie wurde fotografiert.

Für die Detektion der Proteine mit Antikörpern stört der Farbstoff, deswegen wurde die Membran dreimalig mit 1xTBS gewaschen, bevor sie für eine Stunde mit Blocklösung abgesättigt wurde. Durch diesen Zwischenschritt werden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Danach wurde die Membran dreimalig mit Waschlösung gewaschen. In der Erstantikörperlösung wurde die Membran bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran wieder dreimalig gewaschen, dann wurde für eine Stunde in der Zweitantikörperlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten wurde die Membran in ECL-Reagenz getränkt und danach auf eine Glasplatte gelegt sowie mit Klarsichtfolie überspannt. Im ChemiDoc-System (Bio-Rad) ließ sich dann die Chemolumineszenz nachweisen. Dazu wurde der Western Blot mit einer Digitalkamera fotografiert.

ECL (enhanced chemiluminescence) steht für das Phänomen der Lichtquantenfreisetzung, wenn Luminol oxidiert wird, katalysiert durch Meerrettichperoxidase (HRP). Da die Meerrettichperoxidase fest an den

Zweitantikörper gekoppelt ist, stellen sich die entsprechenden Proteinbanden als lichtemittierende Streifen dar (siehe auch Abbildung 2.9).

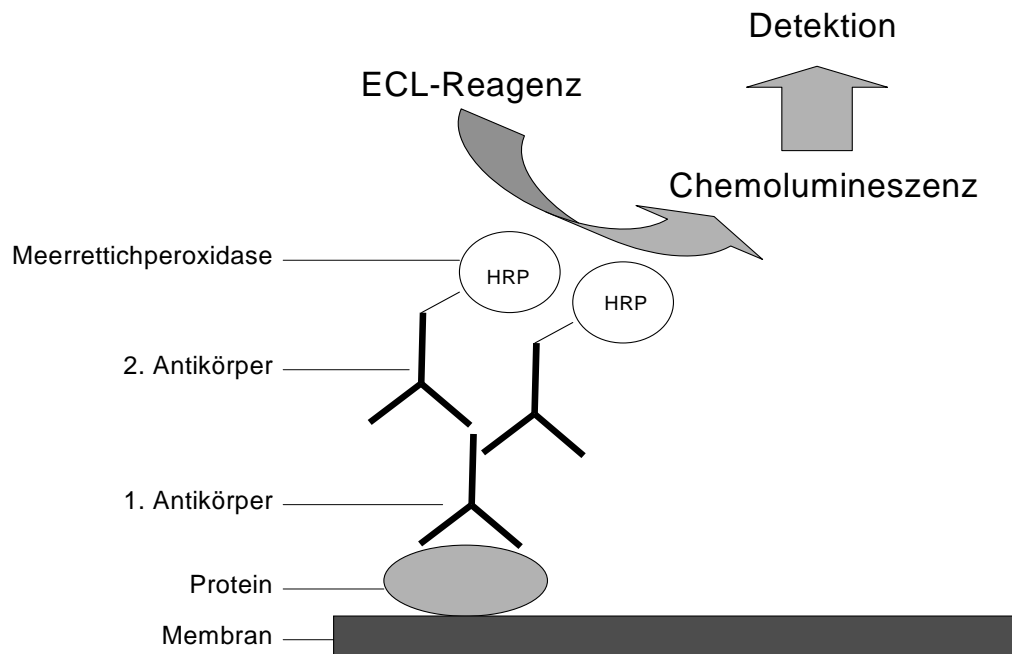


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung des Proteinnachweises

<u>Blocklösung:</u>	Tween 20	0,1 % (vol/vol)
	BSA/ Magermilchpulver	5 % (wt/vol)
	1xTBS	Ad 1l

<u>Waschlösung:</u>	Tween 20	0,1 % (vol/vol)
	1xTBS	Ad 1l

Erstantikörperlösungen:

<u>Für YB-1:</u>	Blocklösung mit 5 % BSA	10 ml
	rabbit-anti-YB-1-Antikörper	17,5 µl

<u>Für Aktin:</u>	Blocklösung mit 5% BSA	10 ml
	mouse-anti-Aktin-Antikörper	10 µl

<u>Für Phospho-SMAD 2 und 3 und 5:</u>	Blocklösung mit	
	Magermilchpulver	10 ml
	rabbit-anti-Phospho-SMAD-	
	Antikörper	10 µl

Zweitantikörperlösungen:

<u>Für YB-1 und Phospho-SMAD:</u>	Blocklösung	
	mit Magermilchpulver	10 ml
	Goat-anti-rabbit-Antikörper	5 µl

<u>Für Aktin:</u>	Blocklösung	
	mit Magermilchpulver	10 ml
	anti-mouse-HRP-Antikörper	5 µl

2.5.6 Auswertung des Western-Blot

Die Auswertung der Western-Blots erfolgte mit dem Programm QuantityOne® der Firma Bio-Rad. Damit wurde am Computer die Intensität der einzelnen Banden ausgemessen. Die Größe der Banden konnte aufgrund des verwendeten Markers bestimmt werden. Zur Auswertung der relativen Proteinexpression wurde die Intensität der untersuchten Proteinbanden zur Intensität der Aktin-Banden derselben Membran ins Verhältnis gesetzt. Aktin wurde zur Normierung der Daten genutzt, weil es stets in gleicher Konzentration in der Zelle vorhanden ist und auch nicht mitreguliert wird.

2.6 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden die Herzmuskelzellen auf Schalen ausplattiert, in die zuvor unter sterilen Bedingungen ein dünnes Glasscheibchen (Coverslip) eingebracht wurde. Des Weiteren wurden die Schalen nicht mit dem üblichen Vorplattiermedium inkubiert, sondern anstelle von FCS wurde Laminin (0,1 %) verwendet, um die Haftung der Zellen zu erhöhen.

Nach erfolgter Infektion wurden die Zellen zunächst auf der Schale mit TBS gewaschen, dann wurde vorsichtig eiskaltes Methanol zugegeben und die Schalen

für 30 min bei -20°C eingefroren. Danach wurden die Schalen dreimalig mit TBS gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blocklösung (TBS; 1 % Tween; 5 % BSA) inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen wurde der Coverslip herausgenommen, auf Parafilm gelegt und mit 300 μl YB-1-Antikörperlösung (1 $\mu\text{g/ml}$ in TBS + 5 % BSA) überschichtet und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Coverslips wieder dreimalig mit TBS gewaschen und danach auf Parafilm mit 300 μl anti-rabbit-Cy2-Lösung (1:500 in TBS + 5 % BSA) überschichtet und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss für 45 min inkubiert. Nach einem letzten dreimaligen Waschschrift wurde der Coverslip vorsichtig getrocknet und verkehrt auf einen Objektträger gelegt, auf den vorher ein Tropfen Einbettmedium (Vecta Shueld) mit DAPI getropft wurde. Danach wurden die Zellen im Durchlichtmikroskop sowie unter zwei verschiedenen Fluoreszenzfiltern (358 nm Anregung und 463 nm Emission für DAPI und 549 nm Anregung und 563 nm Emission für Cy2) beurteilt und fotografiert.

2.7 Erfassung von Hypertrophie in Herzmuskelzellen

2.7.1 Hypertrophiestimulation in isolierten Herzmuskelzellen

Von den gewaschenen Herzmuskelzellen wurden zwei Schalen mit je 1000 MOI Ad-YB-1 Virus und zwei Schalen mit je 1000 MOI Ad-GFP Virus für jeweils 24 h infiziert. Zwei Schalen dienten als nicht infizierte Kontrolle. Nach Ablauf der Infektionsdauer wurde jeweils einer der Schalen der α -Adrenorezeptoragonist Phenylephrin (PE) in der Konzentration 10 μM (1 $\mu\text{l/ml}$ Medium) zur Stimulation der Hypertrophie zugesetzt.

2.7.2 Hypertrophieerfassung durch Ermittlung der Zellgröße

Als Parameter für hypertrophes Wachstum diente die Zunahme der Zellquerschnittsfläche (Cross Sectional Area). Dabei wurden die entsprechend vorher infizierten Zellen 20-24 Stunden mit PE inkubiert und danach wurden pro Schale 30 Zellen fotografiert, vermessen und daraus die Cross Sectional Area ermittelt.

Berechnung der Zellquerschnittsfläche:

$$\text{Cross section} = \pi \times \text{radius}^2$$

2.7.3 Hypertrophieerfassung durch Bestimmung der Proteinbiosyntheserate

In hypertrophen Zellen liegt naturgemäß eine höhere Proteinsyntheserate vor als in normalen Zellen. Im Umkehrschluss lässt eine erhöhte Proteinsyntheserate qualitativ auf Hypertrophie schließen. Um eine vermehrte Proteinproduktion nachzuweisen werden den Zellen radioaktiv markierte Aminosäuren zur Verfügung gestellt, welche in die neu entstehenden Proteine eingebaut werden. Nach einer bestimmten Zeit kann dann die eingebaute Menge dieser radioaktiv markierten Aminosäuren in einem Beta-Counter gemessen werden.

Den Herzmuskelzellen wurden dafür im dreifach Ansatz gleichzeitig zur Hypertrophiestimulation mit PE auch 0,1 µCi/ml L-[U-14C]Phenylalanin (0,1 µl/ml Medium) zugegeben. Das genaue Pipettierschema ist in Abbildung 2.10 dargestellt.

6-Well Schale1 (Kontrolle)		6-Well Schale2 (GFP)		6-Well Schale3 (YB-1)	
-	+Phenylalanin	GFP	+Phenylalanin	YB-1	+Phenylalanin
-		GFP		YB-1	
-		GFP		YB-1	
-	+Phenylalanin	GFP	+Phenylalanin	YB-1	+Phenylalanin
-	+PE	GFP	+PE	YB-1	+PE
-		GFP		YB-1	

Abbildung 2.10: Pipettierschema für die Bestimmung der Proteinbiosyntheserate

Vierundzwanzig Stunden später wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen, um das nicht eingebaute ¹⁴C-Phenylalanin abzuwaschen. Dann wurde den Zellen 1 ml eiskaltes 10%iges TCA zur Proteinfällung zugegeben und sie wurden mindestens 24 h bei 4°C inkubiert. Um die Menge des radioaktiv markierten ¹⁴C-Phenylalanins im intrazellulären Präkursor-Pool (nicht-eingebautes Phenylalanin) zu ermitteln wurden 500 µl des Überstandes in 4 ml Szintillationslösung überführt. Der Rest des Überstandes wurde entfernt und die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und mit 1 ml 1 N NaOH/0,01% SDS behandelt, was zur Zelldenaturierung führt. Nach 1,5 h Inkubation bei 37°C wurden 500 µl dieser Lösung in 4 ml Szintillationslösung überführt und es

wurde im Beta-Counter daraus in Form von Counts per minute (CPM) die Menge des eingebauten radioaktiven ^{14}C -Phenylalanins ermittelt.

Die Gesamtproteinmenge pro Ansatz wurde mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 quantitativ bestimmt. Hierzu wurden 10 μl des Probenüberstandes sowie jeweils 10 μl einer Standardverdünnungsreihe von BSA in 0,01% SDS/ NaOH (1 N; wt/vol) in den Konzentrationen 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1 mg/ml in eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Danach wurden jeweils 200 μl Bradford-Reagenz zugegeben. Im Mikrotiterplatten-Photometer wurde die Extinktion bei 595 nm photometrisch bestimmt. Mit Hilfe der Standardreihe wurde eine Standardgerade ermittelt, um damit die einzelnen Proteinkonzentrationen zu errechnen.

2.8 Erfassung von Apoptose in Herzmuskelzellen

2.8.1 Apoptosestimulation durch $\text{TGF}\beta_1$ in isolierten Herzmuskelzellen

Nach dem Waschen der Herzmuskelzellen wurden die isolierten Herzmuskelzellen zunächst infiziert. Nach Ablauf der Infektionsdauer wurde jeweils die Hälfte der Zellschalen mit Transforming growth factor β_1 ($\text{TGF}\beta_1$, 1 ng/ml) stimuliert.

2.8.2 Annexin-/Propidiumiodid-Färbung apoptotischer Zellen

Veränderungen der Plasmamembran gehören zu den am frühesten eintretenden charakteristischen Anzeichen des Apoptosevorgangs. Während des Apoptosevorgangs findet zu einem sehr frühen Zeitpunkt eine Translokation von Membran-Phospholipid-Phosphatidylserin (PS) von der inneren Seite der Zellmembran auf die äußere Seite statt, wobei die strukturelle Integrität der Membran erhalten bleibt. Annexin V (ANX) bindet an der Zellmembran apoptotischer Zellen, da es ein Phospholipid bindendes Protein mit einer hohen Affinität für PS ist (Vermes *et al.*, 1995). Mit FITC konjugiertes Annexin wird bei einer Wellenlänge von 450-480 nm angeregt und zeigt eine grüne Fluoreszenz. Es ist ein nicht zellmembrangängiges Protein und kann bei intakter Zellmembran nicht ins Innere der Zelle gelangen, weswegen gesunde Zellen nicht angefärbt werden. Da es im Verlauf einer Nekrose zur Schädigung der Zellmembran kommt, kann Annexin dort in die Zellen eindringen und bindet an PS auf der inneren Seite der Zellmembran.

Propidiumiodid ist ein DNA-Farbstoff, der ebenfalls nicht zellmembrangängig ist. Durch ihn werden deshalb nur die Zellkerne und das Cytosol von nekrotischen Zellen angefärbt, da deren Membran geschädigt ist. Propidiumiodid wird mit einem Spektrum von 510-550 nm angeregt und zeigt bei Anregung eine intensive rote Fluoreszenz.

Gesunde Zellen zeigen demnach keine Fluoreszenz, apoptotische nur eine Grünfluoreszenz bei 450-480 nm und nekrotische zeigen sowohl eine Grünfluoreszenz, als auch eine Rotfluoreszenz bei 510-550 nm.

Vier Stunden nach Apoptose-Induktion mit $TGF\beta_1$ wurden die Farbstoffe Annexin-FITC (10 μ l/ml) und Propidiumiodid (5 μ l/ml) in das Kulturmedium gegeben. Durch leichtes Schwenken wurden die beiden Farbstoffe im Medium verteilt, anschließend wurden die Zellen 15 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und danach die Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Im Durchlicht wurden bei 200facher Vergrößerung pro Schale ca. 200 Zellen in willkürlich gewählten Gesichtsfeldern ausgezählt, die anschließend bei entsprechender Wellenlänge auf ihren Anteil an apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen analysiert wurden.

2.8.3 Hoe 33258/ Propidiumiodid-Färbung apoptotischer Zellen

Zwanzig Stunden nach Apoptose-Induktion durch $TGF\beta_1$ wurden pro Milliliter Kulturmedium 10 μ l Hoe 33258 und 5 μ l Propidiumiodid in das Kulturmedium gegeben. Durch leichtes Schwenken wurden die beiden Farbstoffe im Medium verteilt, anschließend wurden die Zellen 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und danach die Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Hoe 33258 ist ein zellmembrangängiger DNA-Farbstoff, der alle Zellen bzw. deren Chromatin im Kern anfärbt. Er wird bei einer Wellenlänge von 340-360 nm angeregt und zeigt dabei eine intensive blaue Fluoreszenz. Dadurch kann die für die Spätphase der Apoptose typische Chromatinkondensation in den Kernen besonders gut dargestellt werden. Des Weiteren kommt es im Zuge der Apoptose zu einer Abkuglung der Zelle und der Zellkerne. Als Gegenfärbung diente Propidiumiodid (siehe 2.8.2). Abbildung 2.11 zeigt die Unterscheidung von apoptotischen, nekrotischen und gesunden Zellen. Im Durchlicht wurden bei 200facher Vergrößerung pro Schale ca. 200 Zellen in willkürlich gewählten Gesichtsfeldern

ausgezählt, die anschließend bei entsprechender Wellenlänge auf ihren Anteil an apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen analysiert wurden.

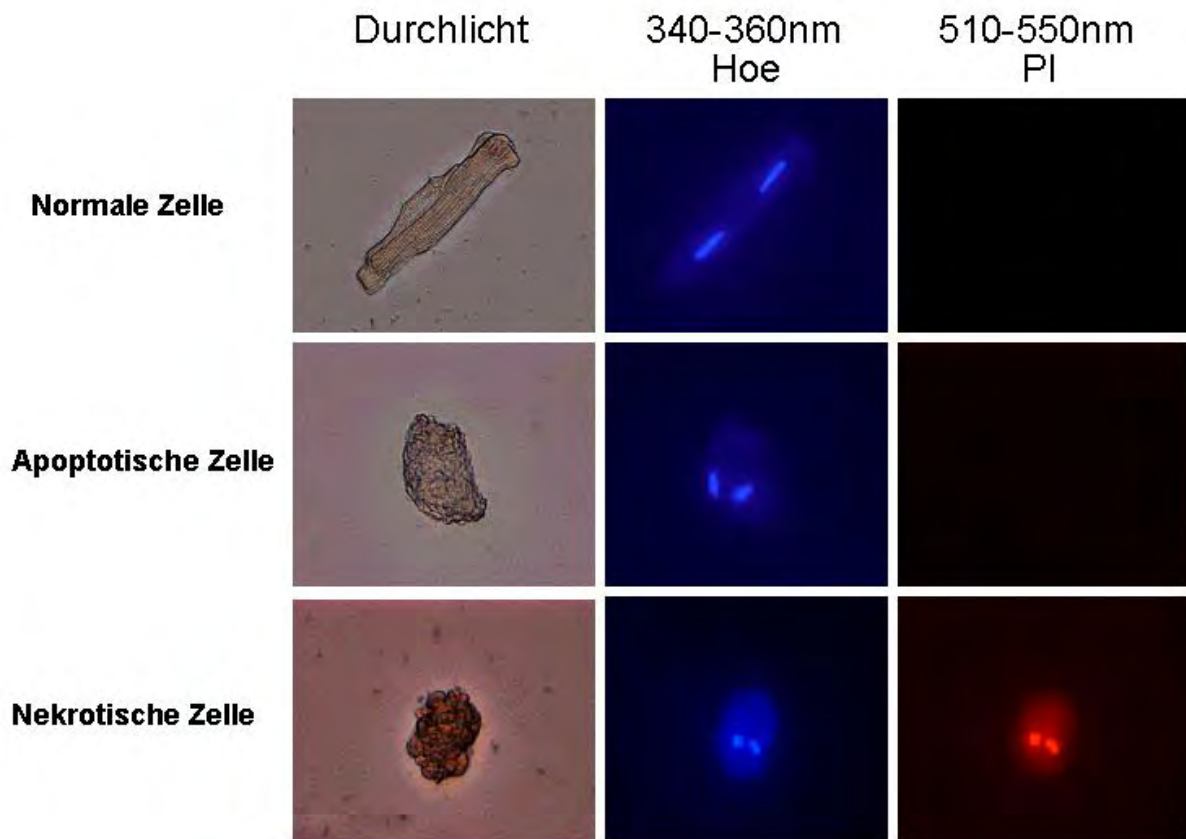


Abbildung 2.11: Unterscheidung von normalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen mit Hilfe der Hoe 33258 / PJ Färbung

2.9 Computerprogramme

Die Auswertung der Realtime PCR erfolgte mit dem Computerprogramm iCycler von Bio-Rad. Die Auswertung der Western-Blots wurde mit dem Programm Quantity one von Molecular Dynamics durchgeführt. Zur Ausmessung der Herzmuskelzellen zwecks Erfassung der Zellquerschnittsfläche bezüglich der Hypertrophieerfassung diente Adobe-Photoshop 5.2. und die Textverarbeitung erfolgte mit den Microsoft Office Programmen Word und Excel. Alle Datenanalysen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS erstellt.

2.10 Statistik

Die Ergebnisse wurden entweder als Mittelwerte \pm Standardabweichung vom Mittelwert (SD) oder als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes aus n verschiedenen Zellpräparationen dargestellt ($n > 3$). Die Daten wurden durch eine ANOVA (One-Way Analysis of Variance) mit nachfolgendem Tukey-Test analysiert. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Virusherstellung und Titerbestimmung von Ad-YB-1

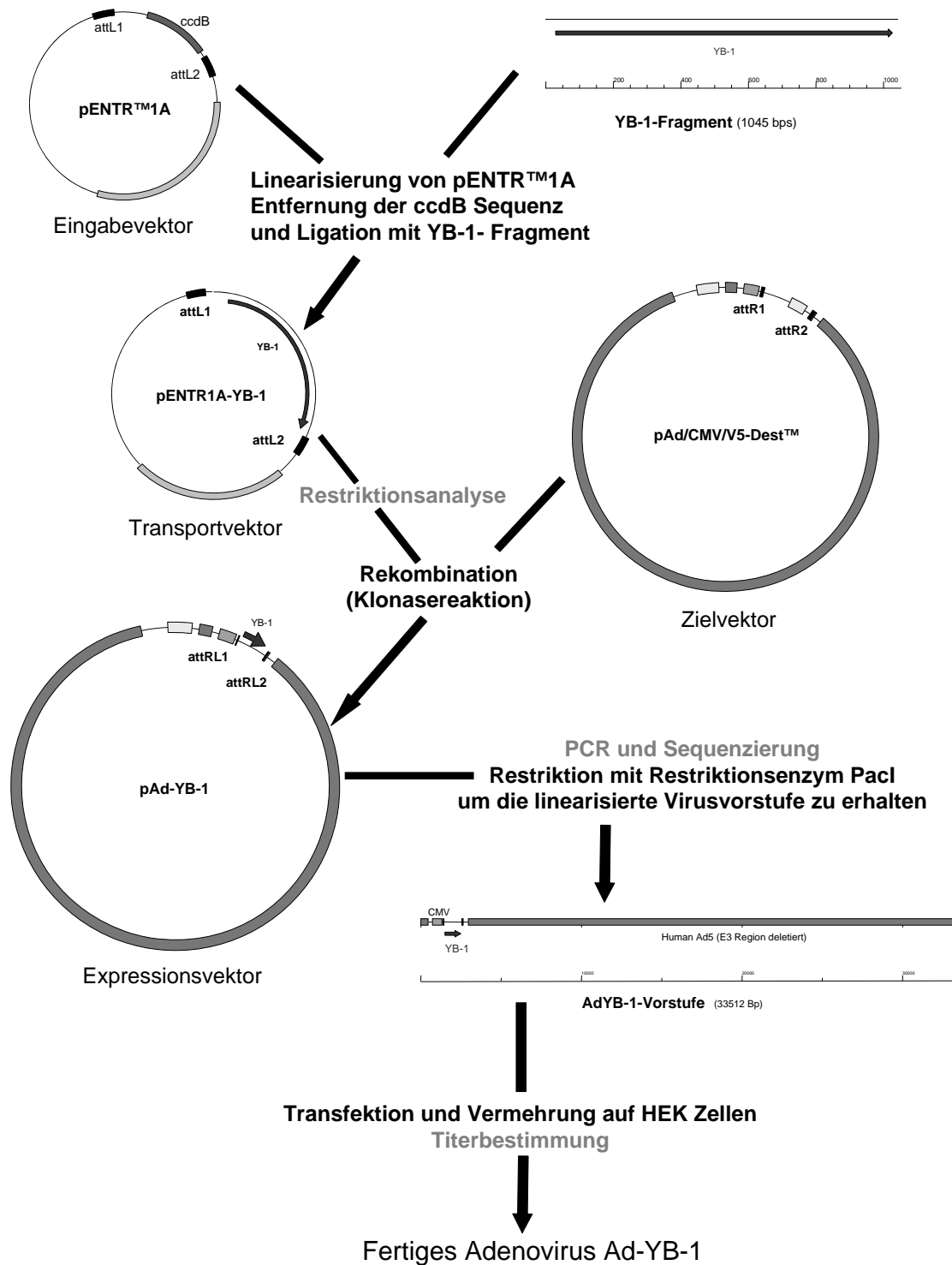


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Herstellung von Ad-YB-1.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem ViraPower™ Adenoviral Expression System von Invitrogen gearbeitet. Dabei wurde die codierende Sequenz von YB-1 aus dem vorliegenden Ausgangsplasmid pcDNA3.1-YB-1 ausgeschnitten und zunächst in das Vektorplasmid pENTR™1A (2717 Bp) einkloniert. Die Einklonierung in Leserichtung wurde durch eine Restriktionsanalyse nachgewiesen.

Mit diesem neu hergestellten Transportvektor pENTR1A-YB-1 (3318 Bp), sowie dem Zielvektor pAd/CMV/V5-Dest™ (36686 Bp) wurde dann eine homologe Rekombination in Form einer Klonasereaktion durchgeführt. Das Ergebnis war der Expressionsvektor pAd-YB-1 (35586 Bp). Der Erfolg dieser homologen Rekombination wurde mittels PCR und anschließend durch eine Sequenzierung nachgewiesen.

Der neue Expressionsvektor pAd-YB-1 wurde dann durch einen Restriktionsschnitt mit dem Restriktionsenzym PacI linearisiert und mit Hilfe einer Transfektion in die HEK-Zellen verbracht. In den HEK-Zellen erfolgte in mehreren Zyklen die Vermehrung des Virus. Danach wurde der Titer bestimmt und eingestellt. Eine Übersicht über die einzelnen Schritte gibt Abbildung 3.1.

3.1.1 Transportvektor pENTR1A-YB-1

Das Ausgangsplasmid pcDNA3.1-YB-1 (6348 Bp) wurde freundlicherweise von Kiyoshi Higashi vom Environmental Health Science Laboratory, Sumitomo Chemical Co., Ltd., Konohana-ku, Osaka 554-8558, Japan zur Verfügung gestellt (siehe Abbildung 3.2).

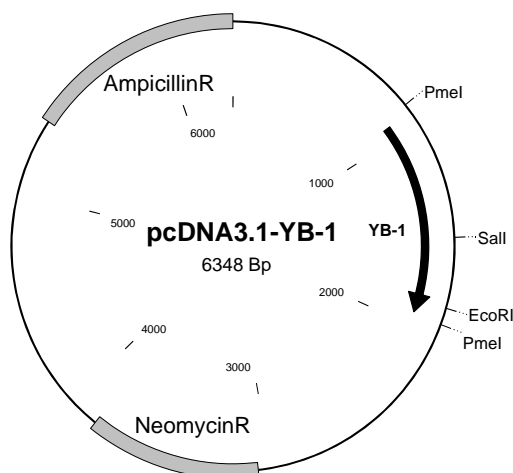


Abbildung 3.2: Das Ausgangsplasmid pcDNA 3.1-YB-1. Die codierende Sequenz für YB-1 wird von zwei Schnittstellen des Restriktionsenzym PmeI flankiert.

Zunächst wurde das Ausgangsplasmid pcDNA3.1-YB-1 mit dem Restriktionsenzym PmeI geschnitten, dann wurde das DNA Fragment mit der codierenden Sequenz für YB-1 mit Hilfe einer Elution isoliert. Das Restriktionsenzym PmeI schneidet „blunt end“, das heißt die beiden DNA Stränge werden genau zwischen zwei Basenpaaren durchgeschnitten, es gibt keinen Überhang (siehe Abbildung 3.15).

Für die Schnitte am Vektor pENTRTM1A wurde dann ebenfalls ein Enzym genutzt, das „blunt end“ schneidet, nämlich EcoRV. Vorher wurde das Vektorplasmid pENTRTM1A mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten und neu ligiert, um die ccdB-Sequenz zu entfernen (Siehe Abbildung 3.3 A und B). CcdB steht dabei für das plasmidcodierte Gen, welches das Wachstum von E. Coli hemmt. Nach der Restriktion mit EcoRV folgte anschließend eine Elution und eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase um die Selbstligation zu vermeiden, die bei großen blunt end geschnittenen Vektoren ansonsten vorkommen würde.

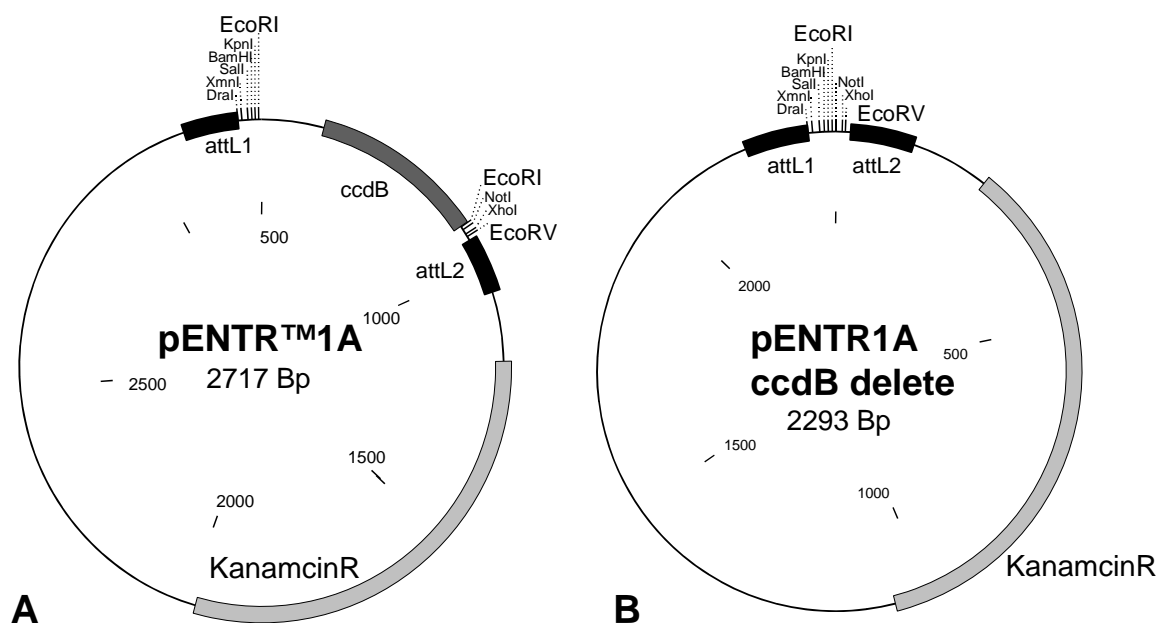


Abbildung 3.3:

(A) Der Ausgangsvektor pENTRTM1A.

(B) Der Ausgangsvektor pENTRTM1A nach Entfernung der wachstumshemmenden ccdB Sequenz. Die EcoRV Schnittstelle liegt am Ende der Multi cloning site.

Nach der Konzentrationsbestimmung im Agarose-Gel wurde eine Ligation durchgeführt. Anschließend wurden die Ligationsprodukte in kompetente Zellen

transformiert und diese wurden auf Kanamycin-Agar angezüchtet. Da die Kanamycin Resistenz durch den Eingabevektor pENTRTM1A vermittelt wird, können dabei nur kompetente Zellen anwachsen, die ein solches Plasmid aufgenommen hatten. Die entstandenen Kolonien wurden in flüssigem Kanamycin-Agar einzeln angezüchtet und die enthaltenen Plasmide durch eine Minipräparation wieder isoliert. Weil das YB-1 Fragment und der Vektor pENTRTM1A beide „blunt end“ geschnitten worden waren, war eine Einklonierung sowohl in Leserichtung, als auch entgegen der Leserichtung möglich (siehe Abbildung 3.4). Die Orientierung der YB-1 Sequenz war jedoch von entscheidender Bedeutung, damit der CMV-Promotor im Expressionsvektor vor der einklonierten YB-1 Sequenz liegt und es so zur Transkription und letztlich zur Translation des YB-1 Proteins kommen kann.

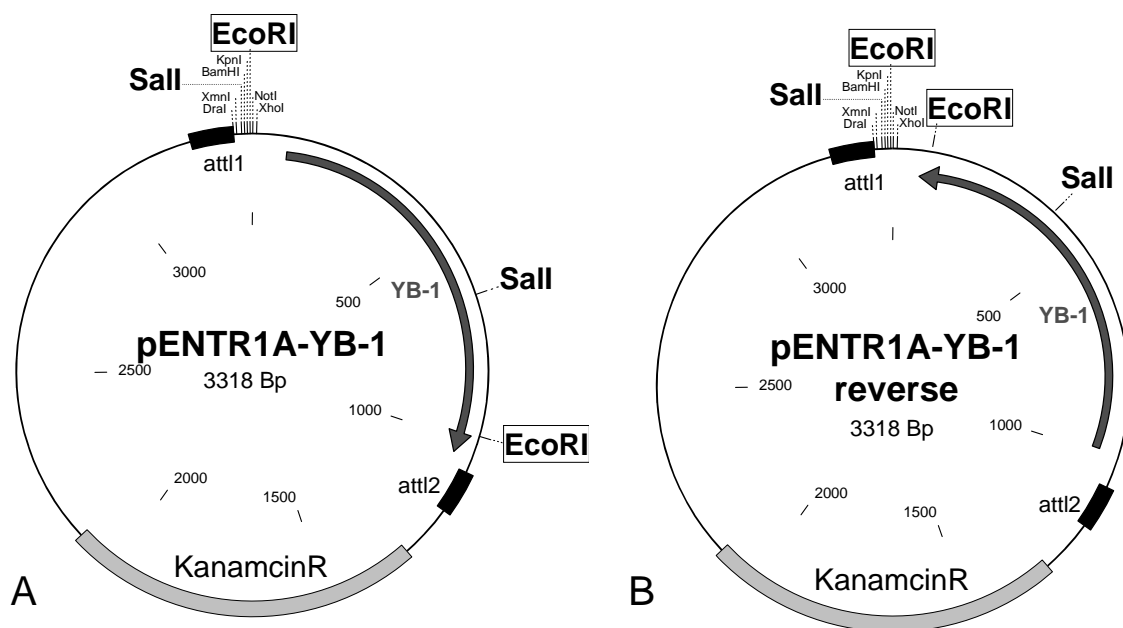


Abbildung 3.4: Die Leserichtung von YB-1 ist durch einen Pfeil dargestellt.

(A) Der Vektor pENTR1A-YB-1: Einklonierung der YB-1 Sequenz in Leserichtung.

(B) Der Vektor pENTR1A-YB-1 reverse: Einklonierung der YB-1 Sequenz entgegen der Leserichtung.

Es liegen bei beiden Vektoren nur zwei EcoRI-Schnittstellen vor. Abhängig von der Einklonierung der YB-1 Sequenz liegen sie unterschiedlich weit auseinander (siehe Abbildung 3.4). Diese Tatsache wurde zur Unterscheidung der beiden Vektoren mit Hilfe einer Restriktionsanalyse genutzt. Dazu wurden alle Minipräparationen zunächst mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten, dann wurden diese

Ergebnisse

Restriktionsansätze auf ein DNA-Gel aufgetragen. Dabei mussten sich zwei Fragmente mit 987 Bp und 2351 Bp ergeben, wenn der Vektor pENTR1A-YB-1 vorlag. Lag der Vektor pENTR1A-YB-1 reverse (siehe Abbildung 3.4) vor, ergaben sich dagegen bei diesem Restriktionsschnitt ein deutlich größeres Fragment mit 3240 Bp und ein sehr kleines mit 98 Bp (siehe Abbildung 3.5).

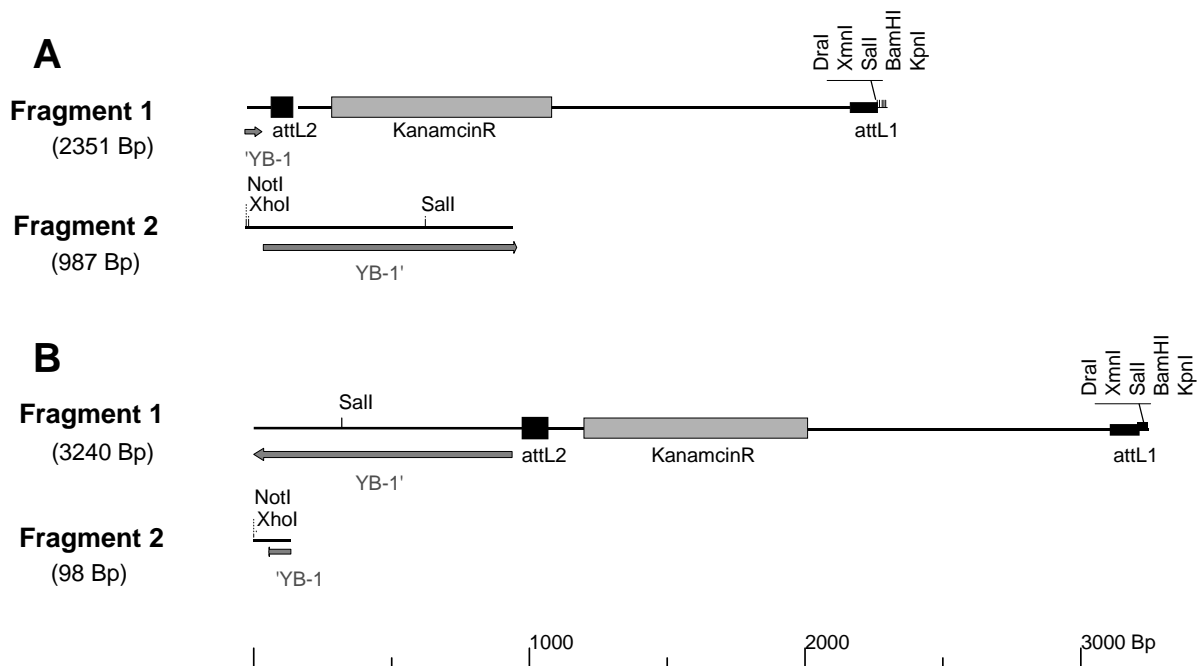


Abbildung 3.5: Fragmente nach Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRV.

(A) Restriktion von pENTR1A-YB-1. Durch Einklonierung der YB-1 Sequenz in Leserichtung ergaben sich zwei Fragmente mit 987 Bp und 2351 Bp.

(B) Restriktion von pENTR1A-YB-1 reverse. Durch Einklonierung der YB-1 Sequenz entgegen der Leserichtung ergaben sich zwei Fragmente mit 98 Bp und 3240 Bp.

Das entsprechende DNA-Gel ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Bei den Minipräparationen 4, 5 und 6 ist sowohl eine Bande bei 2300 Bp, als auch eine Bande bei etwa 990 Bp zu sehen. Bei diesen Minipräparationen kam es zu einer Einklonierung der YB-1 Sequenz in Leserichtung. Es lag hier also der gewünschte Vektor pENTR1A-YB-1 vor. Bei den Minipräparationen 5 und 6 ist noch eine zusätzliche Bande bei 3318 Bp zu sehen. Hier wurde der Vektor nicht vollständig geschnitten, da diese zusätzliche Bande der Größe des ungeschnittenen Vektors entspricht. Bei den Minipräparationen 9 und 10 Gel ist eine Bande bei 3240 Bp zu

sehen. Hier wurde die YB-1-Sequenz entgegen der Leserichtung einkloniert, das 98 BP Fragment ist allerdings auf dem Gel nicht zu sehen, da es zu klein ist.

Des weiteren ist zu sehen, dass pENTR1A ccdB delete in der ungeschnittenen Form auf dem Gel wesentlich kleiner wirkt, da er durch seine Ringstruktur eine Supercoil-Form ausbildet und dadurch auf dem Gel deutlich schneller läuft. Nachdem er durch die Restriktion mit EcoRI linearisiert wurde, zeigt sich seine tatsächliche Größe auf dem Gel, nämlich etwa 2293 Bp.

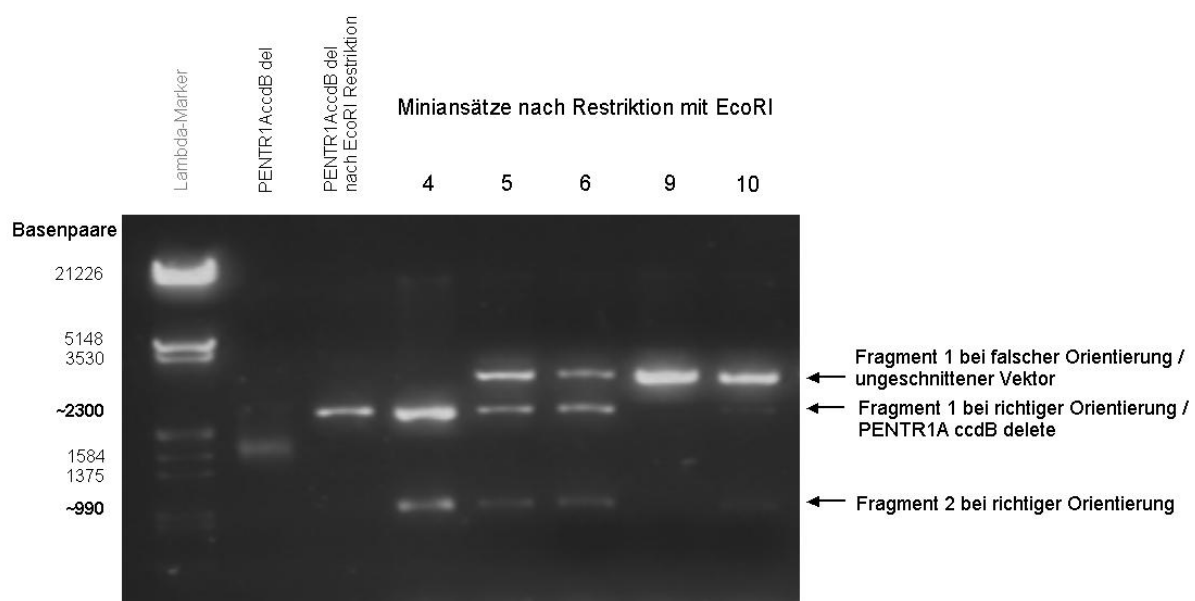


Abbildung 3.6: DNA Gel nach Restriktion mit EcoRI.

Zur weiteren Absicherung wurde mit den Minipräparationen noch eine Restriktionsanalyse mit dem Restriktionsenzym Sall durchgeführt. Auch dessen Schnittstellen liegen unterschiedlich weit auseinander, abhängig von der Einklonierung der YB-1 Sequenz (siehe Abbildung 3.4). Es ergaben sich dabei für pENTR1A-YB-1 zwei Fragmente mit 2654 Bp und 684 Bp und für pENTR1A-YB-1 reverse zwei Fragmente mit 2899 Bp und 439 Bp (siehe Abbildung 3.7).

Das entsprechende DNA-Gel ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Bei allen Minipräparationen wurde bei der Restriktionsanalyse der Vektor nicht vollständig geschnitten, deshalb ist bei allen eine Bande bei etwa 3318 Bp zu sehen. Bei den Minipräparationen 4, 5 und 6 ist eine Bande bei etwa 2654 Bp zu sehen. Diese Bande spricht für eine Einklonierung der YB-1 Sequenz in Leserichtung. Bei den

Ergebnisse

Minipräparationen 9 und 10 ist eine Bande bei etwa 2899 Bp zu sehen, also wurde die Sequenz hier entgegen der Leserichtung einkloniert. Auf dem Gel sind nur die Banden von 3318 Bp, 2899 Bp und 2654 Bp zu sehen, die anderen Fragmente sind zu klein.

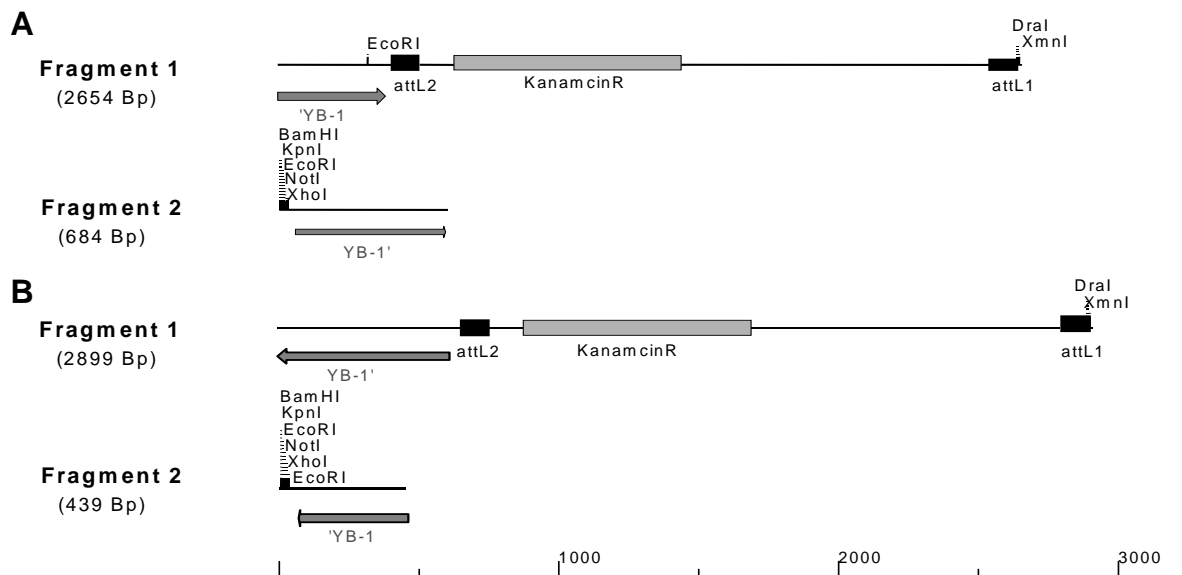


Abbildung 3.7: Fragmente nach Restriktion mit dem Restriktionsenzym Sall.

(A) Durch Einklonierung der YB-1 Sequenz in Leserichtung ergaben sich zwei Fragmente mit 2654 Bp und 684 Bp.

(B) Durch Einklonierung der YB-1 Sequenz entgegen der Leserichtung ergaben sich zwei Fragmente mit 2899 Bp und 439 Bp.

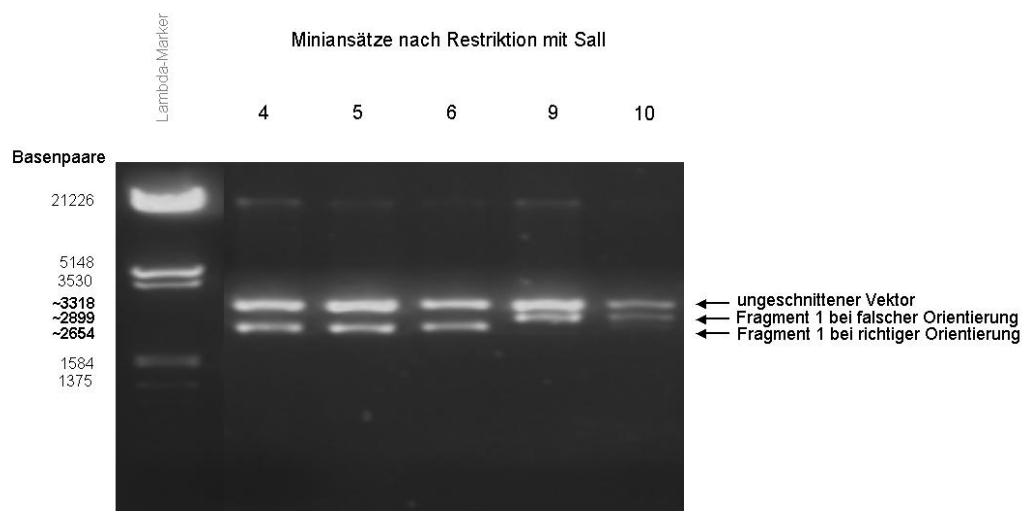


Abbildung 3.8: DNA-Gel nach Restriktion mit Sall.

Nach Auswertung der beiden Restriktionsschnitte ergab sich also eindeutig, dass die hier dargestellten Minipräparationen 4, 5 und 6 dem Transportvektor pENTR1A-YB-1 entsprachen, während die ebenfalls dargestellten Minipräparationen 9 und 10 dem unerwünschten Nebenprodukt pENTR1A-YB-1 reverse entsprachen.

3.1.2 Expressionsvektor pAd-YB-1

Nachdem die Minipräparation 4 als Transportvektor pENTR1A-YB-1 identifiziert war, wurde hiervon eine Maxipräparation durchgeführt. Danach folgte die homologe Rekombination (Klonasereaktion) mit dem Vektor pAd/CMV/V5-DestTM (siehe Abbildung 3.9) und eine Transformation in kompetente Zellen. Danach wurden diese auf Ampicillin-Agar angezüchtet, da der Vektor eine Ampicillin Resistenz vermittelt und somit nur kompetente Zellen anwachsen konnten, die einen Expressionsvektor aufgenommen hatten. Die Chloramphenicol-Resistenz von pAd/CMV/V5-DestTM geht durch die Klonasereaktion verloren.

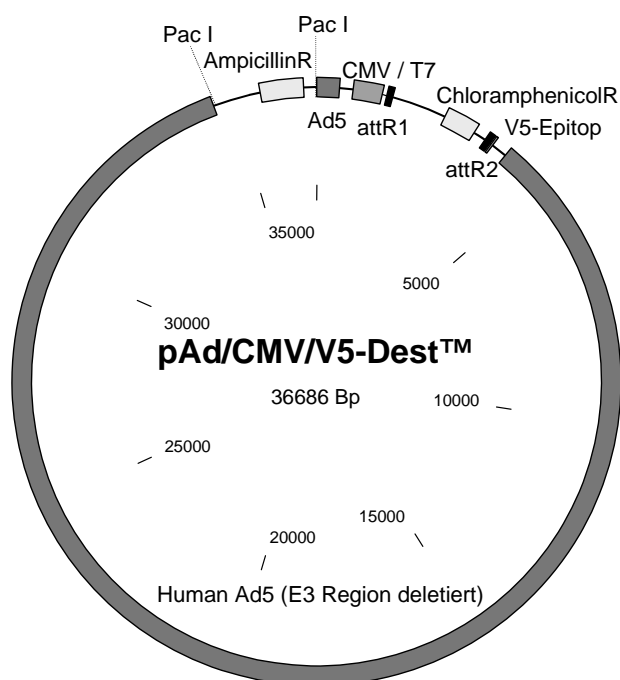


Abbildung 3.9: Der Zielvektor pAd/CMV/V5-DestTM

Die entstandenen Kolonien wurden in flüssigem Ampicillin-Agar einzeln angezüchtet und die enthaltenen Plasmide durch eine Minipräparation isoliert. Mit diesen Miniansätzen wurde eine PCR durchgeführt, um das Vorhandensein der YB-1

Ergebnisse

Sequenz im neu entstandenen Expressionsvektor pAd-YB-1 (siehe Abbildung 3.10) nachzuweisen.

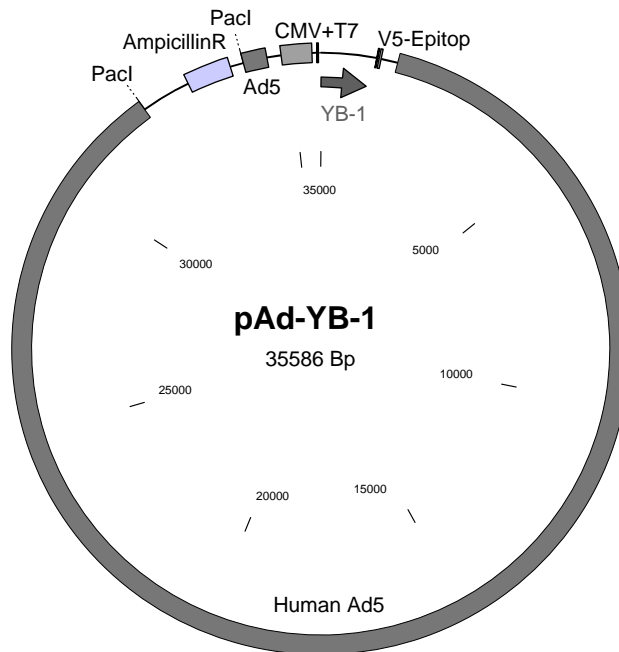


Abbildung 3.10: Der Expressionsvektor pAd-YB-1

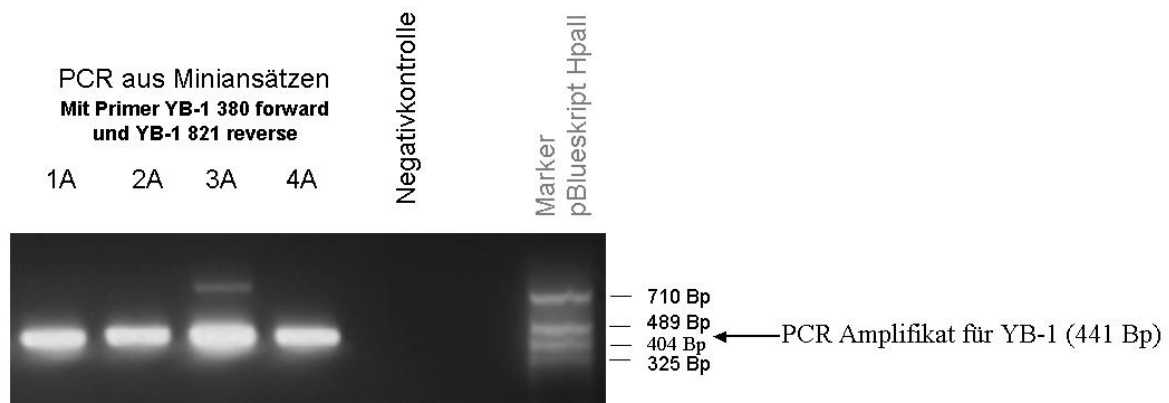


Abbildung 3.11: PCR aus den Miniansätzen 1A bis 4A.

Das DNA-Gel dieser PCR ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Bei allen Miniansätzen ist nach der PCR im Gel eine Bande von 441 Bp zu sehen, das entspricht der Größe des Amplifikats für YB-1. In der Negativkontrolle ist keine Bande vorhanden. Die PCR ist also aussagekräftig und ergibt ein positives Ergebnis für 1A - 4A. Bei 3A ist

allerdings eine zusätzliche Bande bei etwa 750 Bp zu sehen. Möglicherweise kam es bei dieser Minipräparation zu einer fehlerhaften doppelten Einklonierung.

Nachdem nun mit Hilfe der PCR ein positiver Befund für die Miniansätze 1A, 2A und 4A gefunden wurde, wurden sie in einer Maxipräparation vervielfältigt und zum Sequenzieren geschickt. Es zeigte sich bei allen eine vollständige Eingliederung der YB-1 Sequenz in den Zielvektor. Die Sequenz des neuen Expressionsvektors pAd-YB-1 ist in Abbildung 3.12 dargestellt.

```

.....(1261)...TTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCA
GAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACT
ATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGTTAAGCTATCAACAAGTTTCtacaaaaagcaggctttaaggaa
ccaattcagtcgactggatccggtaccgaattcgcggccgactcgagataaacttaagcttcagtcaccatcaccgcaacc
atgagcagcgaggccgagaccagcagccgcccgcgcccccccgccgccccgcctcagcgccgcgacaccaagcccg
cactacgggcagcgccgagcggtggccggcgccctcacatcgccgcccgcctgccggcggggacaagaaggtcatcgc
aacgaaggttttgggaacagtaaaatggttcaatgtaaggaacggatatggttcatcaacaggaatgacaccaaggaagatgtattgt
acaccagactgccataaagaagaataaccccaggaagtaccttcgcagtgtaggagatggagagactgtggagtttgatgttgaag
gagaaaaggggtgcggaggcagcaaatgttacaggtcctggtggtgttcagttcaaggcagtaaatatgcagcagaccgtaaccattat
agacgctatccacgtcgtaggggtcctccacgcaattaccagcaaaattaccagaatagtgagatggggaaaagaacgagggatcg
gagagtgtcccgaaggccaggcccaacaacgcccgcctaccgcaggcgaagggtcccaccttactacatgcggagaccctatgg
gcgtcgaccacagtatccaaccctcctgtgcaggggagaagtgtgaggggtgctgacaaccaggggtgcaggagaacaaggtagac
cagtgaggcagaatatgtatcggggatatagaccacgattccgcaggggcccctcctcgccaaagacagcctagagaggacggcaat
gaagaagataaaagaaaatcaaggagatgagaccaaggtcagcagccacctaacgtcggtagccgccaactcaattaccgacg
cagacgcccagaaaaccctaaccacaagatggcaaaagagacaaaagcagccgatccaccagctgagaattcgtccgctccgacg
gctgagcagggcggggctgagtaaatctagagggcccgttttatctagaccagctttCTTGTAAGAGTGGTTGAT
CTAGAGGGCGCCGCGGTTCTGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTAC
GCGTACCGGTTAGTAATGAGTTTAAACGGGGGAGGCTAACTGA.....(3781).....

```

Abbildung 3.12: DNA Sequenz von pAd-YB-1. Die DNA Sequenz aus dem Zielvektor pAd/CMV/V5-Dest ist in Großbuchstaben dargestellt, die DNA Sequenz aus dem Eingabevektor pENTR1A ist fett gedruckt. Die codierende Sequenz für das YB-1 Protein ist unterstrichen.

3.1.3 Das Virus Ad-YB-1

Nachdem ein positives Ergebnis in der Sequenzierung vorlag, wurde der Expressionsvektor pAd-YB-1 aus der Präparation 1A mit dem Restriktionsenzym PacI linearisiert und es wurde damit auch die nun nicht weiter benötigte Ampicillin-Resistenz entfernt (siehe Abbildung 3.13). Danach wurde eine Transfektion mit Lipofectamin von HEK-Zellen durchgeführt. Nach Entstehung eines cytopathischen Effektes nach etwa 10 Tagen wurde das Virus geerntet und auf HEK-Zellen in mehreren Zyklen vermehrt.

Nach mehreren Vermehrungszyklen wurde eine Titerbestimmung durchgeführt und daraufhin wurde der Titer des Virus zur Infektion der Kardiomyozyten auf 1×10^9 ifu/ml

eingestellt. Zur Infektion der Kardiomyozyten dienten dann jeweils 10 µl der Viruslösung pro Milliliter Kardiomyozyten-Medium. Das entspricht einer Infektionsdosis von 1000 MOI.

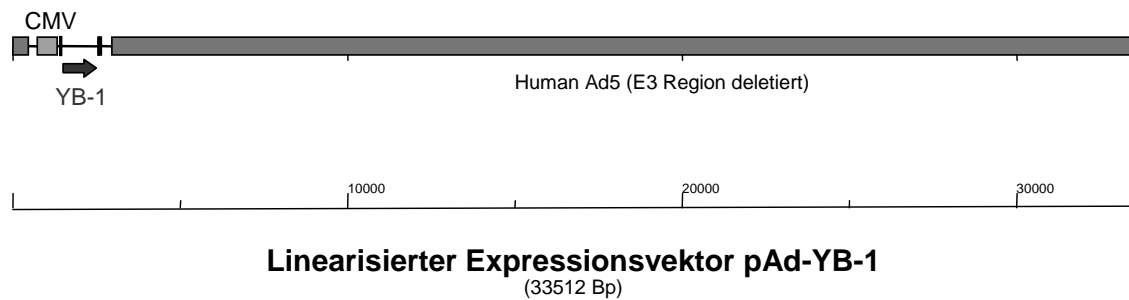


Abbildung 3.13: Expressionsvektor pAd-YB-1 nach Restriktion mit dem Restriktionsenzym PacI

3.2 Virusherstellung und Titerbestimmung von Ad-GFP

Eine Übersicht über die Herstellungsschritte eines Adenovirus gibt Abbildung 2.1.

3.2.1 pENTR1A-GFP

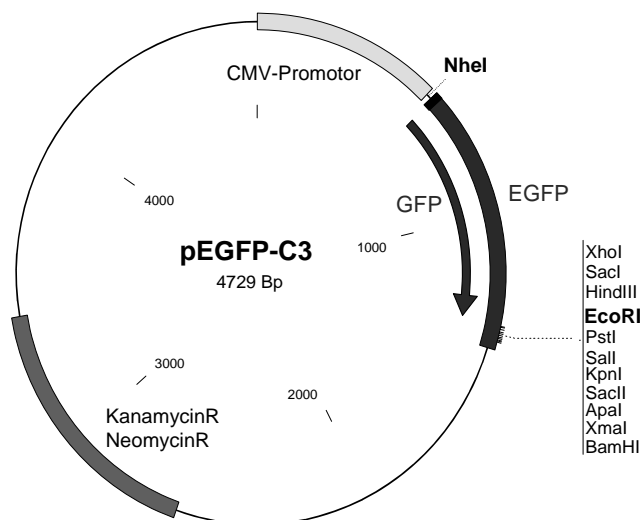


Abbildung 3.14: Ausgangsplasmid pEGFP-C3

Das Ausgangsplasmid pEGFP-C3 wurde freundlicherweise von Professor Axel Gödecke; Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurde das Ausgangsplasmid mit den Restriktionsenzymen NheI und EcoRI geschnitten, darauf folgte die Auftrennung im Agarose-Gel und eine Elution des GFP Fragmentes mit anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion.

Da diese beiden Restriktionsenzyme mit Überhang schneiden (siehe Abbildung 3.15) und im vorher schon hergestellten Eingangsvektor pENTR1A ccdB delete keine dazu passenden Schnittstellen vorhanden waren, mussten diese Überhänge entfernt werden. Das Fragment wurde deshalb mit DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment behandelt um ein Fragment mit blunt ends zu erhalten.



Abbildung 3.15: Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme

Gleichzeitig wurde der Vektor pENTR1A ccdB delete mit dem Restriktionsenzym EcoRV ebenfalls blunt end geschnitten. Dann folgten eine Auftrennung im Agarose-Gel und eine Elution des Vektors mit anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion und des weiteren eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase um die Selbstligation zu verhindern. Nach der Konzentrationsbestimmung im Agarose-Gel wurde eine Ligation durchgeführt und anschließend eine Transformation der Ligationsprodukte auf kompetente Zellen und deren Anzucht auf Kanamycin-Agar. Die entstehenden Kolonien wurden in flüssigem Kanamycin-Agar einzeln angezüchtet und die enthaltenen Plasmide durch eine Minipräparation wieder isoliert.

Für den gewünschten Transportvektor pENTR1A-GFP (siehe Abbildung 3.17) musste die GFP Sequenz in Leserichtung einkloniert sein. Um das festzustellen, wurde mit den einzelnen Minipräparationen eine Restriktionsanalyse mit dem Restriktionsenzym DdeI durchgeführt.

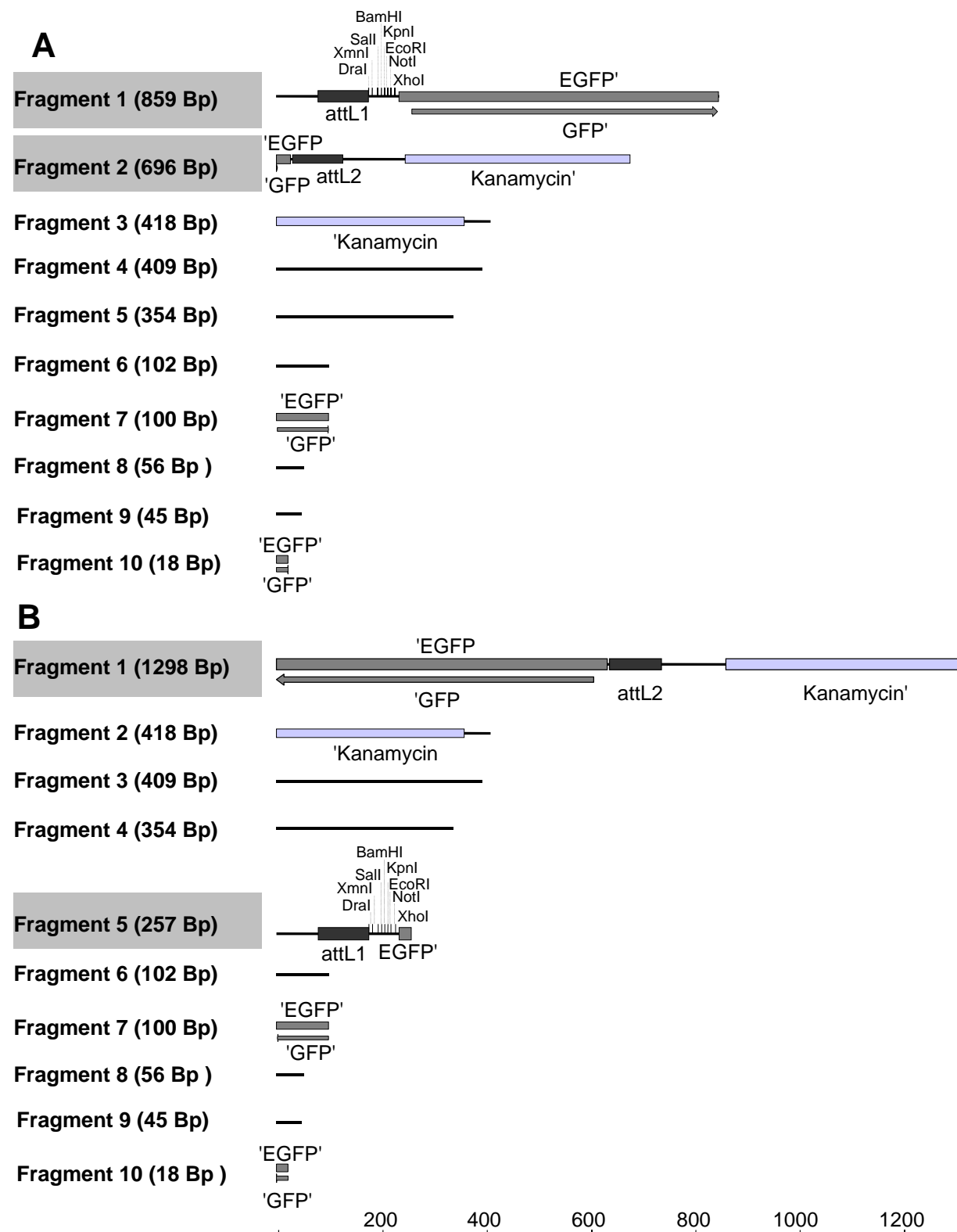


Abbildung 3.16: Fragmente nach Restriktion mit dem Restriktionsenzym DdeI.

(A) Durch Einklonierung der GFP Sequenz in Leserichtung ergeben sich zehn Fragmente, vor allem die zur Unterscheidung dienenden Fragmente 1 mit 859 Bp und 2 mit 696 Bp.

(B) Durch Einklonierung der GFP Sequenz entgegen der Leserichtung ergeben sich zehn Fragmente, vor allem die zur Unterscheidung dienenden Fragmente 1 mit 1298 Bp und 5 mit 257 Bp.

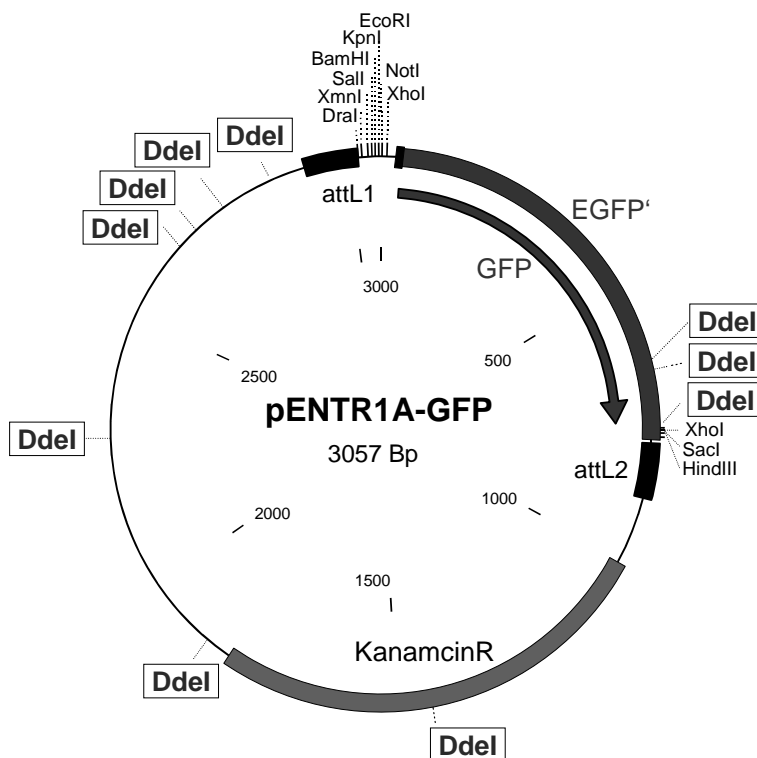


Abbildung 3.17: Der Transportvektor pENTR1A-GFP. Einklonierung der GFP Sequenz in Leserichtung. Die Schnittstellen für das Restriktionsenzym Ddel sind eingezeichnet.

Die Größe der DNA Banden nach diesem Restriktionsschnitt liegt bei dem Transportvektor pENTR1A-GFP bei 859 Bp, 696 Bp, 418 Bp, 409 Bp, 354 Bp, 102 Bp, 100 Bp, 56 Bp, 45 Bp und 18 Bp (siehe Abbildung 3.16A). Ist jedoch die GFP Sequenz entgegen der Leserichtung einkloniert, so liegen die Banden bei 1298 Bp, 418 Bp, 409 Bp, 354 Bp, 257 Bp, 102 Bp, 100 Bp, 56 Bp, 45 Bp und 18 Bp (siehe Abbildung 3.16B). In geringem Umfang kann es trotz der Behandlung mit alkalischer Phosphatase zu einer Selbstligation des Vektors kommen. In die kompetenten Zellen wird dann der Vektor pENTR1A ccdB delete transformiert und vermehrt. In diesem Fall liegen die Banden der entsprechenden Minipräparation nach Ddel Restriktion bei 911 Bp, 418 Bp, 409 Bp, 354 Bp, 100 Bp, 56 Bp und 45 Bp.

Auf dem DNA-Gel (siehe Abbildung 3.18) sind nur die größeren Banden ab 257 Bp zu sehen, die anderen Bruchstücke waren zu klein und dementsprechend auf dem Gel zu weit gelaufen. Bei allen Minipräparationen sind Banden bei 418 Bp, 409 Bp, und 354 Bp zu sehen. Diese Banden sind unabhängig von einer Einklonierung des GFP-Fragmentes.

Ergebnisse

Bei den Minipräparationen 12K und 20K zeigt sich nur eine zusätzliche Bande bei 911 Bp. Diese Bandenverteilung entspricht der von pENTRTM1A ccdB delete. Daraus lässt sich schließen, dass bei diesen Minipräparationen keine GFP-Sequenz einkloniert wurde. Die Minipräparation 11K zeigt zwei zusätzliche Banden bei 1298 Bp und 257 Bp. Das spricht dafür, dass hier die GFP-Sequenz entgegen der Leserichtung einkloniert wurde. Die Minipräparation 10K zeigt zwei zusätzliche Banden bei 859 Bp und 696 Bp. Bei dieser Minipräparation wurde die GFP-Sequenz in Leserichtung einkloniert. Bei der Minipräparation 19K liegt ein unklares Bandenmuster vor, möglicherweise wurde die GFP-Sequenz hier mehrfach einkloniert.

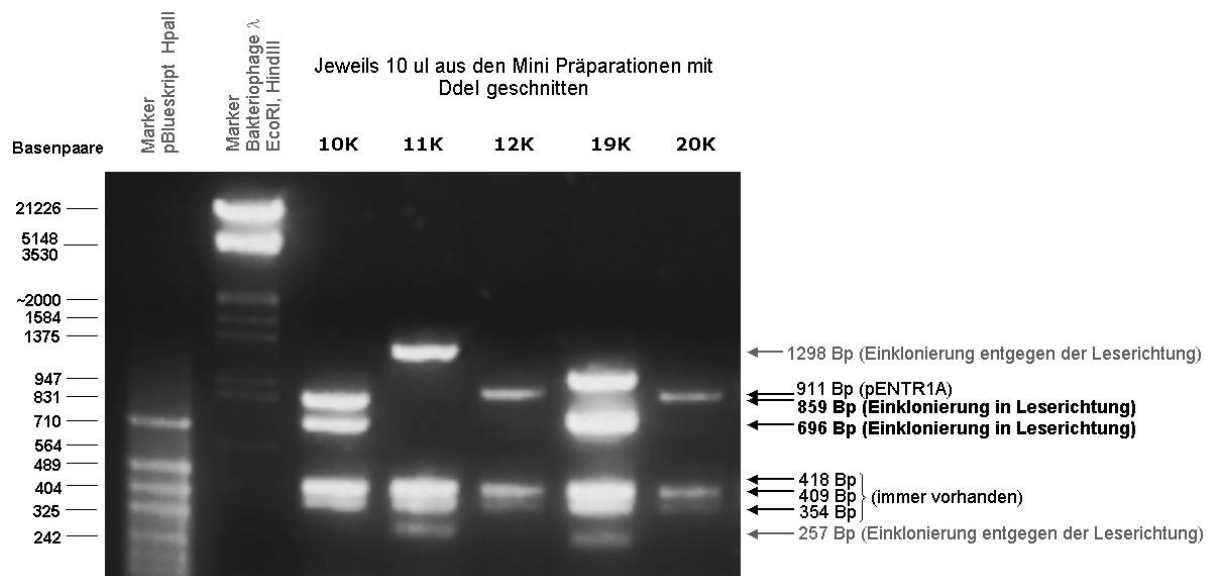


Abbildung 3.18: DNA-Gel nach Restriktionsanalyse mit DdeI.

Mit Hilfe dieser Restriktionsanalyse ließ sich in der Minipräparation 10K eindeutig die in Leserichtung einklonierte GFP-Sequenz nachweisen. Diese Minipräparation entspricht somit dem Transportvektor pENTR1A-GFP.

3.2.2 Expressionsvektor pAd-GFP

Nachdem die Einklonierung der GFP-Sequenz in Leserichtung nachgewiesen war wurde eine Maxipräparation von Miniansatz 10K durchgeführt. Es folgte eine homologe Rekombination und eine Transformation auf kompetente Zellen, sowie deren Anzucht auf Ampicillin-Agar.

Die entstehenden Kolonien wurden in flüssigem Ampicillin-Agar einzeln angezüchtet und die enthaltenen Plasmide durch eine Minipräparation wieder isoliert. Danach wurden die Minipräparationen ohne vorherige Restriktion auf ein Gel aufgetragen und außerdem wurde eine PCR mit anschließendem DNA-Gel durchgeführt, um das Vorhandensein der GFP-Sequenz im neu entstandenen Expressionsvektor pAd-GFP zu bestätigen (siehe Abbildung 3.19).

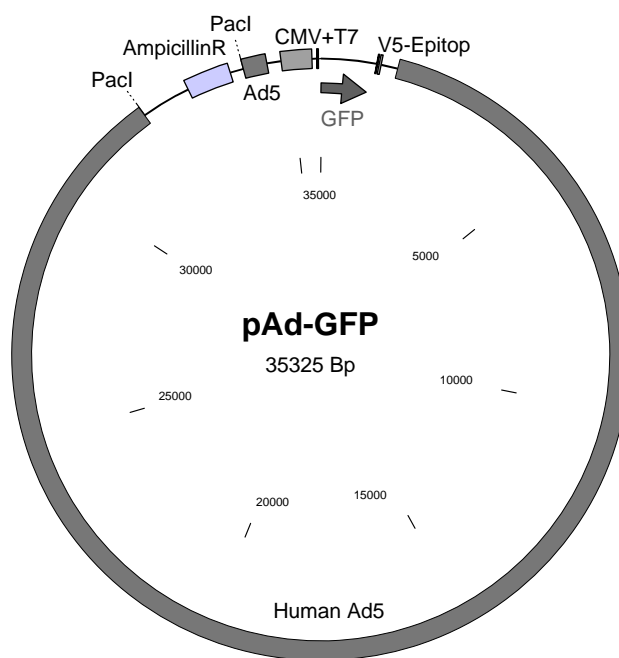


Abbildung 3.19: Der Expressionsvektor pAd-GFP

Der Expressionsvektor pAd-GFP hat eine Größe von 35325 Bp. Nur die Minipräparation 3M liegt im DNA-Gel der Minipräparationen (Abbildung 3.20) deutlich über 20000 Bp: Die anderen Minipräparationen 1M, 2M, 4M und 5M liegen etwa bei 2000 Bp und sind damit deutlich zu klein. Die Plasmide liegen allerdings ungeschnitten vor und daher wirken sie auf dem Gel etwas kleiner, weil sie durch ihre Ringstruktur eine Supercoil-Form ausbilden und dadurch auf dem Gel schneller laufen. Es könnte sich bei diesen Minipräparationen aufgrund der Größe um den Transportvektor pENTR1A-GFP (3057 Bp) handeln.

Ergebnisse

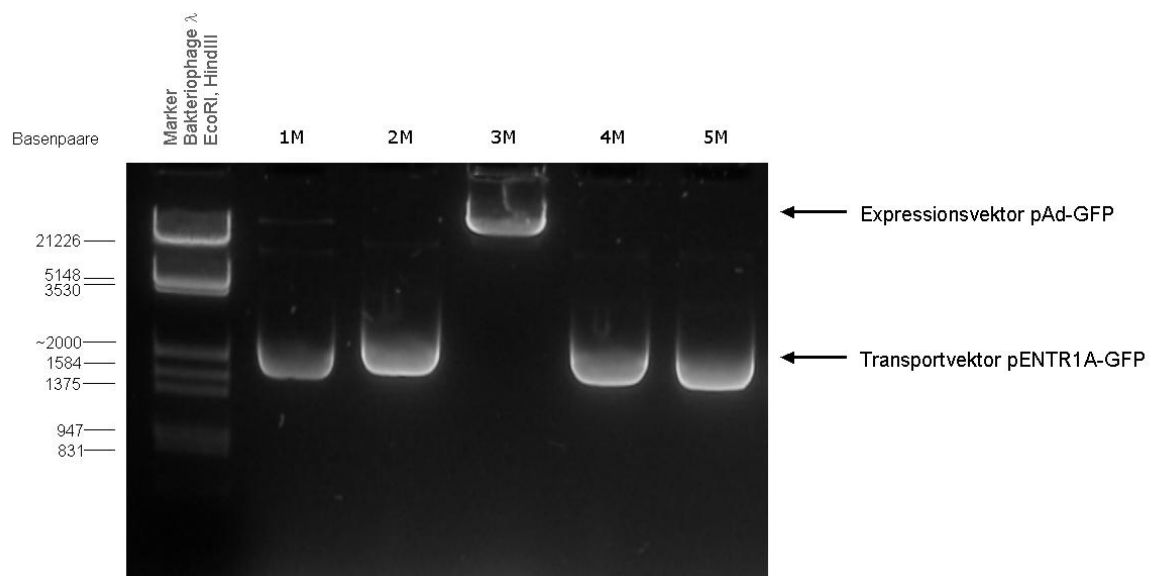


Abbildung 3.20: DNA Gel der Minipräparationen 1M bis 5M

In der PCR zeigt sich bei allen Minipräparationen eine Bande bei etwa 300 Bp, entsprechend dem PCR Amplifikat für GFP, während bei der Negativkontrolle keine Bande zu sehen ist. Die PCR ist demnach aussagekräftig und zeigt, dass in allen Minipräparationen die GFP Sequenz vorhanden ist.

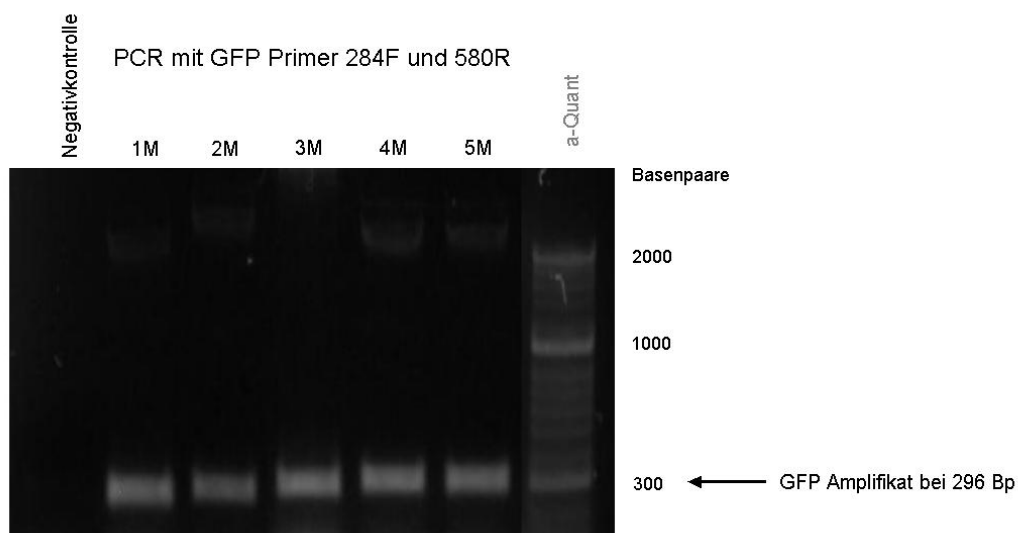


Abbildung 3.21: DNA Gel der PCR von den Minipräparationen 1M bis 5M

Kombiniert man nun die Ergebnisse aus dem DNA-Gel und der PCR, so kommt man zu dem Schluss, dass in den kompetenten Zellen der Minipräparationen 1M, 2M, 4M

und 5M aufgrund der Größe und dem Vorhandensein der GFP-Sequenz der Transportvektor pENTR1A-GFP vervielfältigt wurde. Wie es zu dieser Vervielfältigung kam, ist unklar, da kompetente Zellen mit einem pENTR1A Plasmid (und der Kanamycin-Resistenz) auf Ampicillin-Agar nicht anwachsen können. Möglicherweise wurde in diese Zellen bei der Transformation sowohl der Expressionsvektor pAd-GFP, als auch ein Plasmid pENTR1A-GFP eingeschleust. Dann wäre die Zelle resistent gegen Ampicillin, aber der deutlich kleinere Vektor pENTR1A-GFP würde sich viel schneller vervielfältigen und wäre fast ausschließlich auf dem Gel zu sehen. In der Minipräparation 3M liegt der erwünschte Expressionsvektor pAd-GFP vor. Zur weiteren Absicherung wurde er in einer Maxipräparation vervielfältigt und zum Sequenzieren geschickt. Es zeigte sich eine vollständige Einklonierung der GFP Sequenz in den Zielvektor (siehe Abbildung 3.22).

```

.....(1261)...TTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGC
AGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTC
ACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGTTAAGCTATCAACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG
CTTaaaggaaccaattcagtcgactggatccggtaccgaattcgcggcgccacactagcgctaccggtcgccaccatgggtg
agcaagggcgaggagctgttcaccgggggtggtgccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcggtg
tccggcgaggggcgaggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctgg
cccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttctcaagtc
cgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagacccgcgcccaggtgaagtt
cgaggggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctg
gagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaactcaagatccgcc
caacatcgaggacggcagcggtgcagctcgccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgccg
acaaccactacctgagcaccagtcgcccctgagcaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctgagttcgtga
ccgcccggggatcactctcgccatggacgagctgtacaagtccggactcagatctcgagctcaagcttgaattatctaGACCC
AGCTTTCTTGTACAAAGTGGTTGATCTAGAGGGCCCGCGGTTTCGAAGGTAAGCCTATCCC
TAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTTAGTAATGAGTTTAAACGGGGGA
GGCTAACTGA.....(3781).....

```

Abbildung 3.22: DNA-Sequenz von pAd-GFP. Die DNA-Sequenz aus dem Zielvektor pAd/CMV/V5-Dest ist in Großbuchstaben dargestellt, die DNA-Sequenz aus dem Eingabevektor pENTR1A ist fett gedruckt. Die codierende Sequenz für das GFP-Protein ist unterstrichen.

3.2.3 Das Virus Ad-GFP

Nachdem ein positives Ergebnis in der Sequenzierung vorlag, wurde der Expressionsvektor pAd-GFP aus der Präparation 3M mit dem Restriktionsenzym PacI linearisiert und es wurde damit auch die nun nicht weiter benötigte Ampicillin-Resistenz entfernt (siehe Abbildung 3.23). Danach wurde eine Transfektion mit Lipofectamin auf HEK-Zellen durchgeführt. Nach Entstehung eines cytopathischen

Ergebnisse

Effektes nach etwa 10 Tagen wurde das Virus geerntet und auf HEK-Zellen in mehreren Zyklen vermehrt.

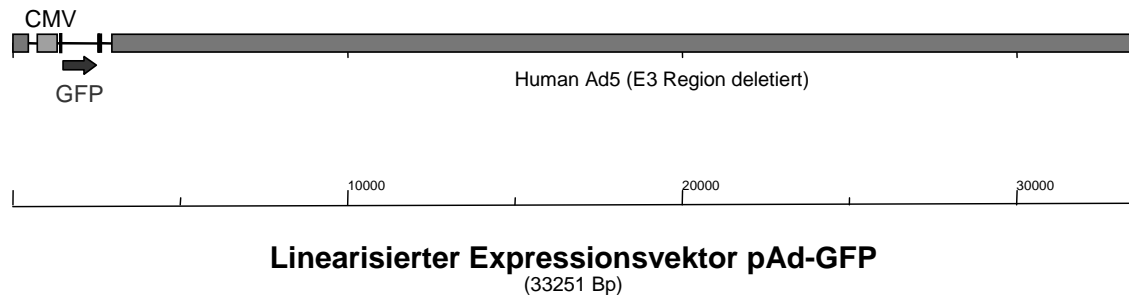


Abbildung 3.23: Expressionsvektor pAd-GFP nach Restriktion mit dem Restriktionsenzym PacI

Nach mehreren Vermehrungszyklen wurde eine Titerbestimmung durchgeführt und daraufhin wurde der Titer des Virus zur Infektion der Kardiomyozyten auf 1×10^9 ifu/ml eingestellt. Zur Infektion der Kardiomyozyten dienten dann jeweils 10 μ l der Viruslösung pro Milliliter Kardiomyozyten-Medium. Das entspricht einer Infektionsdosis von 1000 MOI. Sowohl in den HEK-Zellen als auch bei infizierten Kardiomyozyten zeigte sich je nach Infektionsdosis nach 24-30h eine deutliche grüne Fluoreszenz (siehe Abbildung 3.24).

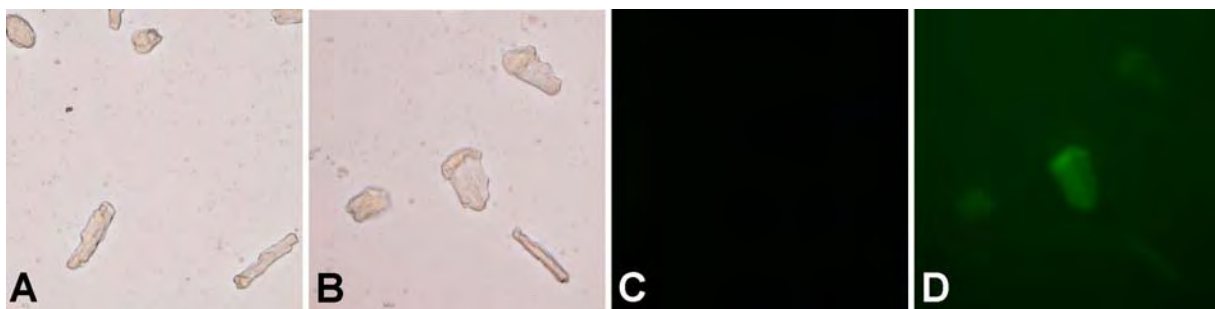


Abbildung 3.24: Unbehandelte Herzmuskelzellen als Kontrolle im Durchlicht (A) und bei 450 nm (C). Für 24h mit 1000 MOI Ad-GFP infizierte Zellen im Durchlicht (B) und bei 450 nm (D).

3.3 Nachweis der Funktionalität der Viren

3.3.1 Anstieg der relativen YB-1 mRNA Expression

Zum Nachweis der Transkription der viral eingebrachten DNA Sequenz wurden Herzmuskelzellen für 6h, 12h, 18h und 24h mit 1000 MOI Ad-YB-1 Virus infiziert. Als

Kontrolle dienten Zellen, die 24h mit 1000 MOI Ad-GFP Virus infiziert wurden, sowie unbehandelte Zellen. Nach der entsprechenden Zeit wurde die RNA aus den Zellen isoliert und nach DNase Verdau in cDNA umgeschrieben. Danach folgte eine Realtime PCR mit den Primern für YB-1 und HPRT als Housekeeping Gen zum Nachweis der relativen YB-1 mRNA Menge (siehe Abbildung 3.25).

Es zeigte sich in dieser Realtime PCR im Zeitverlauf der Infektion eine Steigerung der relativen YB-1 mRNA Expression. Nach 12h Infektion war ein Anstieg von $1,02 \pm 0,27$ (Kontrolle) auf $1,61 \pm 0,53$ zu sehen, nach 18h ein Anstieg auf etwa das fünffache ($5,48 \pm 1,41$) und nach 24h signifikant auf etwa das zwanzigfache ($22,11 \pm 10,51$). Das zur Kontrolle dienende Virus Ad-GFP hatte auch nach 24h Infektionsdauer keinen Einfluss auf die relative YB-1 mRNA Expression ($1,26 \pm 0,30$).

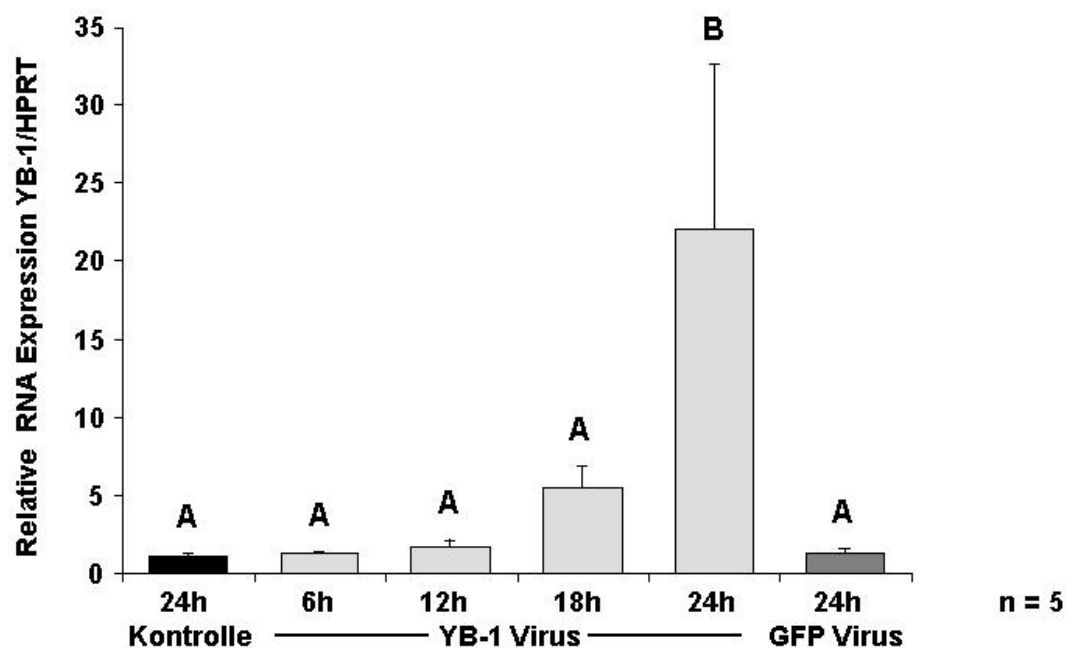


Abbildung 3.25: Relative mRNA Expression von YB-1 in einer quantifizierten Realtime PCR. Infektion der Zellen mit 1000 MOI Ad-YB-1 für 6h, 12h, 18h und 24h sowie 1000 MOI Ad-GFP für 24h. Isolation von Gesamt RNA und Herstellung von cDNA. Die Realtime PCR ist normiert auf HPRT. Dargestellt ist der Mittelwert aus fünf Versuchsansätzen und zugehörige Standardabweichung. Signifikant unterschiedliche Gruppen sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet.

Die Infektion mit Ad-YB-1 führte zu einer spezifischen Überexpression von YB-1 mRNA. Mit steigender Infektionsdauer stieg auch die Menge an exprimierter YB-1

mRNA Es handelte sich dabei nicht um einen unspezifischen viralen Effekt, da es nach Infektion mit Ad-GFP zu keinem Anstieg der YB-1 mRNA Expression kam.

3.3.2 Anstieg der relativen YB-1 Proteinexpression

Zum Nachweis der Translation der viral eingebrachten DNA Sequenz wurden Herzmuskelzellen für 12h, 18h, 24h, 30h und 36h mit 1000 MOI Ad-YB-1 Virus infiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die 36h mit 1000 MOI Ad-GFP Virus infiziert wurden, sowie unbehandelte Zellen. Nach der entsprechenden Zeit wurde aus den Zellen das Gesamtprotein extrahiert und es wurde ein Western Blot mit YB-1 Antikörpern durchgeführt (siehe Abbildung 3.26).

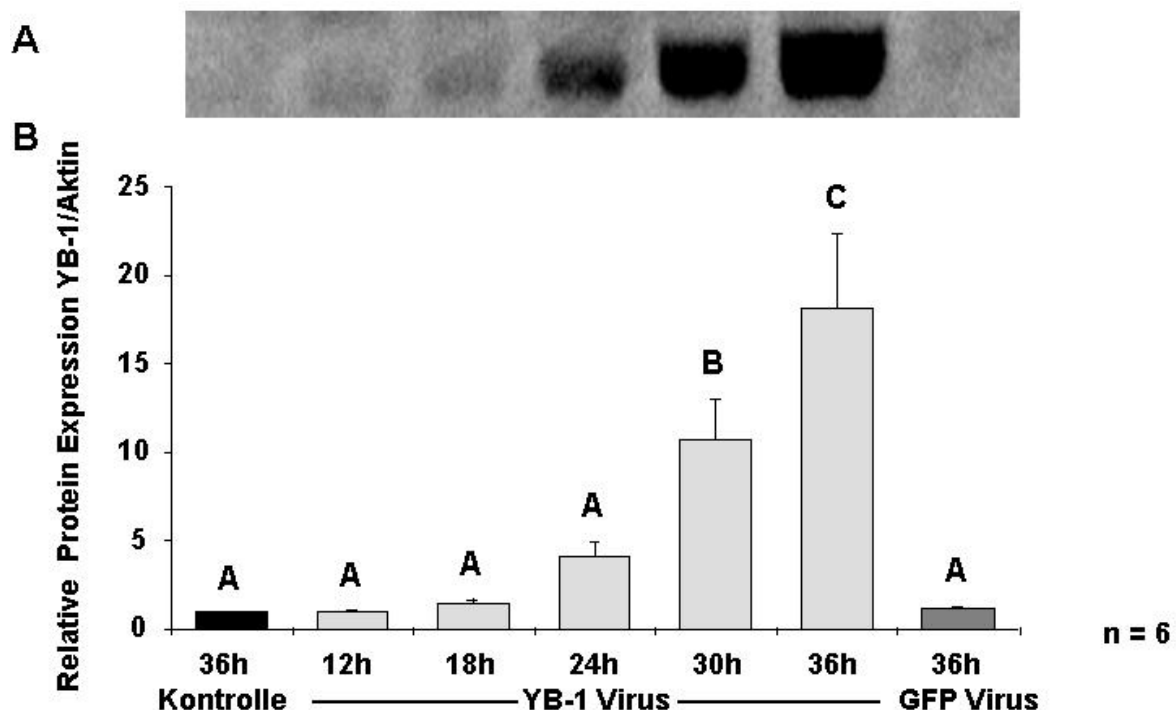


Abbildung 3.26:

(A) Repräsentativer Western Blot mit YB-1 Antikörpern.

(B) Relative YB-1 Protein Expression nach 12h, 18h, 24h, 30h und 36h Infektion mit 1000 MOI Ad-YB-1 und 36h Infektion mit 1000 MOI Ad-GFP. Western Blot aus Gesamtprotein normiert auf Aktin. Dargestellt sind der Mittelwert aus sechs Versuchsansätzen und der Standardfehler des Mittelwertes. Signifikant unterschiedliche Gruppen sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet.

Im Western Blot zeigte sich eine Steigerung der relativen YB-1 Proteinexpression im Zeitverlauf der Infektion. Während nach 12h mit $0,99 \pm 0,07$, nach 18h mit $1,51 \pm 0,14$ und nach 24h mit $4,07 \pm 0,87$ noch kein signifikanter Unterschied zu der

unbehandelten Kontrolle ($1,00 \pm 0,00$) festgestellt werden konnte, zeigte sich nach 30h ein signifikanter Anstieg auf $10,66 \pm 2,38$ und nach 36h auf $18,16 \pm 4,17$.

Eine Infektion mit 1000 MOI Ad-GFP für 36h führte zu keiner Veränderung der YB-1 Proteinexpression ($1,16 \pm 0,07$).

Zum Nachweis, dass die Proteinexpression auch von der Menge des eingesetzten Virus abhängt, wurden Herzmuskelzellen für 24h mit 100 MOI, 500 MOI und 1000 MOI Ad-YB-1 infiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die 24h mit 1000 MOI Ad-GFP Virus infiziert wurden, sowie unbehandelte Zellen nach 24h .

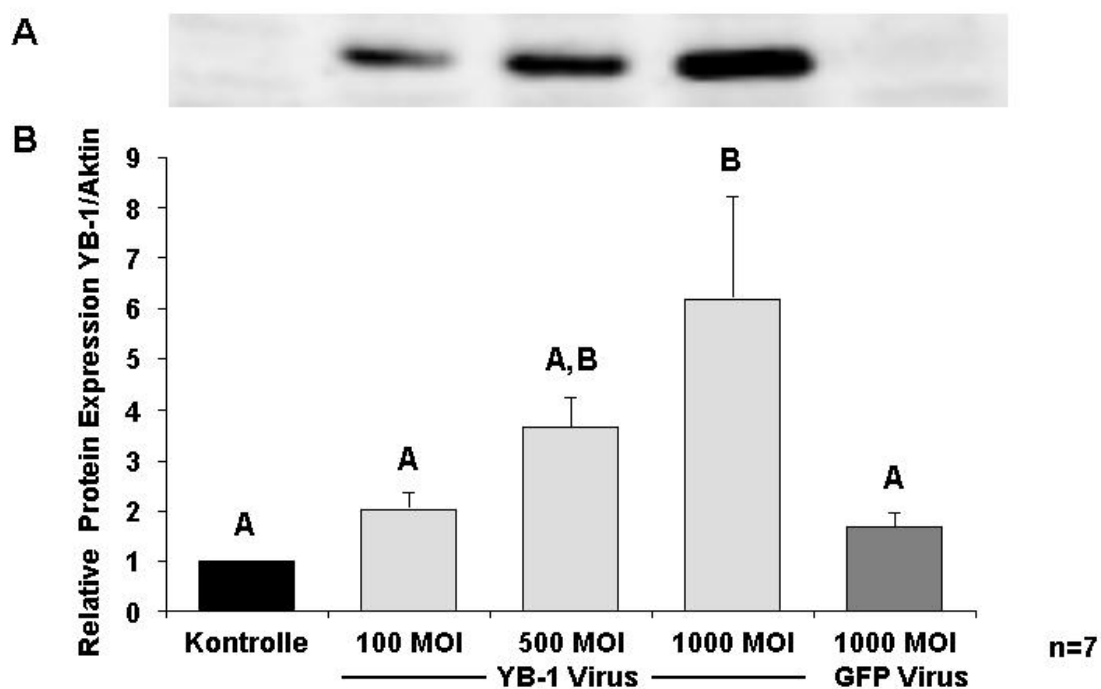


Abbildung 3.27:

(A) Repräsentativer Western Blot mit YB-1 Antikörpern.

(B) Relative YB-1 Protein Expression nach 24h Infektion mit 100 MOI; 500 MOI und 1000 MOI Ad-YB-1, sowie 24h Infektion mit 1000 MOI Ad-GFP. Western Blot aus Gesamtprotein normiert auf Aktin Banden. Dargestellt sind der Mittelwert aus sieben Versuchsansätzen und der Standardfehler des Mittelwertes. Signifikant unterschiedliche Gruppen sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet.

Es zeigte sich dabei mit steigender Infektionsdosis auch eine Steigerung der relativen YB-1 Proteinexpression. Bei 100 MOI ergab sich ein Anstieg auf $2,03 \pm 0,35$ im Vergleich zur Kontrolle ($1,00 \pm 0,00$). Bei 500 MOI kam es zu einem Anstieg auf $3,65 \pm 0,59$ und bei 1000 MOI zu einem signifikanten Anstieg auf $6,20 \pm 2,03$. Die

Infektion mit dem Kontrollvirus Ad-GFP hatte keinen signifikanten Einfluss auf die relative YB-1 Protein Expression ($1,68 \pm 0,28$).

Eine Infektion mit dem Virus Ad-YB-1 führte abhängig von der Infektionsdauer und der Infektionsdosis zu einer spezifischen Steigerung der Menge an YB-1 Protein in den Herzmuskelzellen. Dabei ist eine signifikante Steigerung bereits ab 24 Stunden nachzuweisen. Ein viraler Effekt kann ausgeschlossen werden, da eine Infektion mit Ad-GFP keine Steigerung der YB-1 Proteinmenge zur Folge hat.

3.3.3 Verteilung von YB-1 in der Herzmuskelzelle

Um einerseits die Überexpression, und andererseits die Verteilung von YB-1 in der Herzmuskelzelle nachzuweisen, wurden Herzmuskelzellen für 30h mit 1000 MOI Ad-YB-1 infiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen nach 0 und 30h, sowie eine Negativkontrolle, die nicht mit Erstantikörper inkubiert wurde. Danach wurde eine Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen YB-1 durchgeführt (siehe Abbildung 3.28).

Bei der Negativkontrolle (3.28; 2A) zeigt sich nur eine sehr schwache Fluoreszenz. Dadurch, dass kein Erstantikörper vorhanden ist, kann der Zweitantikörper nicht binden und dementsprechend ist nur eine Hintergrundfluoreszenz nachweisbar. Wäre in dieser Negativkontrolle eine Fluoreszenz nachweisbar, würde das für einen ungenügenden Waschschrift oder eine unspezifische Bindung des Zweit-Antikörpers sprechen. Da das hier nicht der Fall ist, ist die hier zu sehende Fluoreszenz spezifisch für YB-1. Bei den nicht infizierten Kontrollzellen zeigt sich direkt nach dem Ausplattieren in der Immunfluoreszenz (3.28; 2B) eine deutliche Verteilung der Fluoreszenz auf die Sarkomerstruktur. Bei den Kontrollzellen nach 30h Kultur ist die Strukturierung in der Herzmuskelzelle deutlich geringer (3.28; 3B). Bei den für 30h mit 1000 MOI Ad-YB-1 infizierten Zellen zeigt sich in der Immunfluoreszenz eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (3.28; 4B). Es ist eine deutliche Überexpression von YB-1 zu erkennen. Diese Überexpression von YB-1 findet im Cytosol statt, da eine gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz im Cytosol zu sehen ist, während die Zellkerne (3.28; 3D) nicht angefärbt sind. Eine Strukturierung der Zelle ist kaum noch auszumachen.

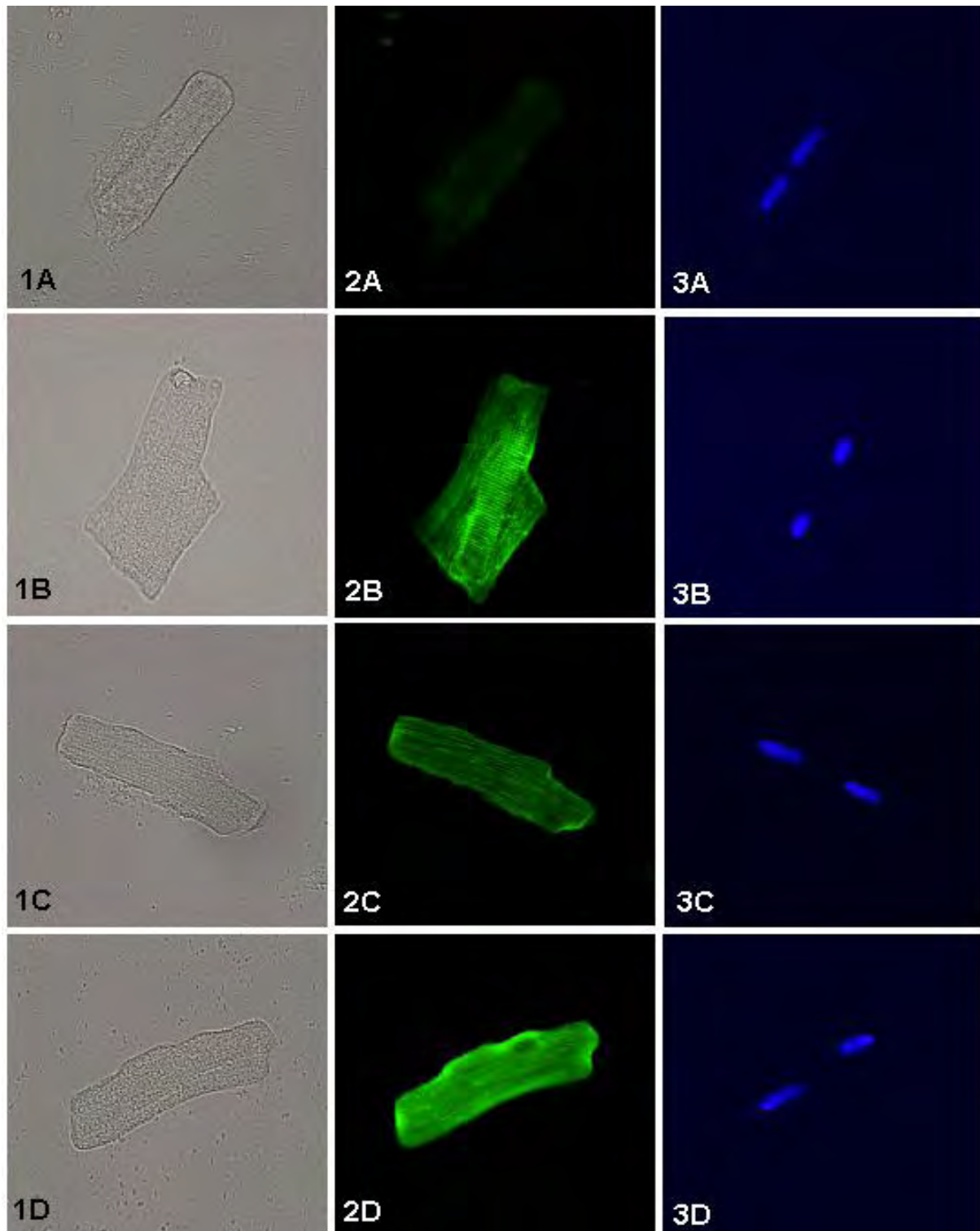


Abbildung 3.28: (1) Durchlichtaufnahmen einzelner Herzmuskelzellen. (2) Bei 549-563 nm Immunfluoreszenz mit YB-1 Antikörper. (3). Bei 358-463 nm Kernfärbung mit DAPI.

- (A) Negativkontrolle unbehandelter Zellen ohne Erstantikörper, nur mit Zweitantikörper inkubiert.
- (B) Nicht infizierte Kontrollzellen nach dem Ausplattieren.
- (C) Nicht infizierte Kontrollzellen nach 30h Kultur.
- (D) Mit 1000 MOI Ad-YB-1 infizierte Zellen nach 30h.

3.4 YB-1 hemmt die Phenylephrin induzierte Hypertrophie

3.4.1 YB-1 hemmt das durch PE induzierte Größenwachstum

Um die Auswirkung von YB-1 auf die durch PE induzierte Hypertrophie zu untersuchen, wurden zwei Schalen mit Herzmuskelzellen mit 1000 MOI Ad-YB-1 und zwei weitere Schalen mit 1000 MOI Ad-GFP infiziert. Zwei Schalen dienten als nicht infizierte Kontrolle. Nach 24h Infektion wurde jeweils eine Schale von jeder Gruppe mit 10 μM PE inkubiert. Weitere 24h später wurde die Zellquerschnittsmessung durchgeführt (siehe Abbildung 3.29).

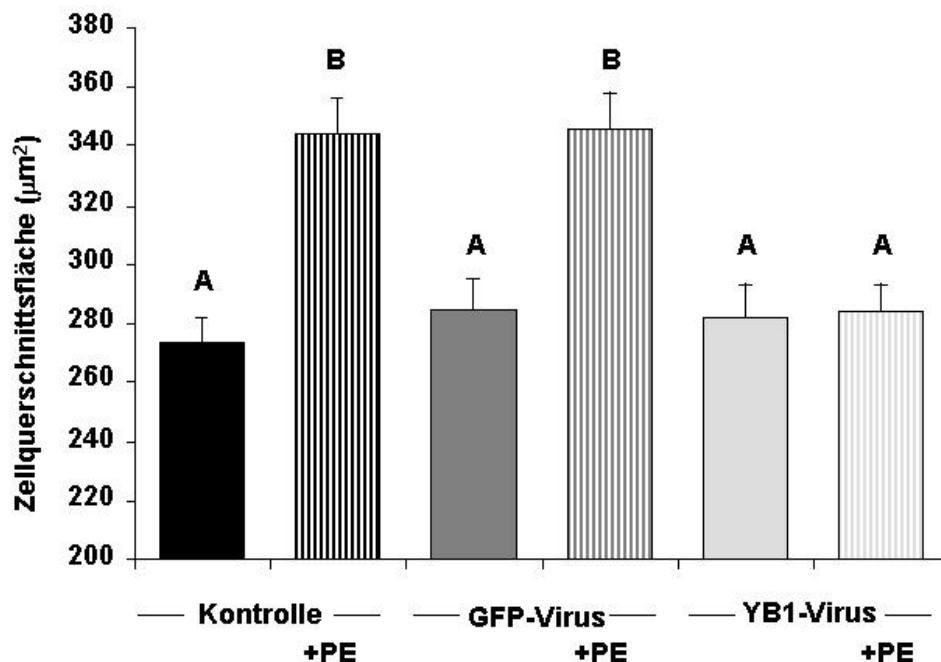


Abbildung 3.29: Hypertrophie nach 24h Infektion mit 1000 MOI Ad-GFP und 1000 MOI Ad-YB-1 und nach 24h Hypertrophieinduktion mit PE. Die Zellen wurden im Durchlichtmikroskop fotografiert und danach wurde der Zellradius (r) ausgemessen. Die Zellquerschnittsfläche errechnet sich aus πr^2 . Dargestellt sind der Mittelwert von 150 Zellen aus fünf unabhängigen Versuchsansätzen und der zugehörige Standardfehler des Mittelwertes. Signifikant unterschiedliche Gruppen sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet.

Bei der Kontrollgruppe kam es nach Induktion mit PE zu einer signifikanten Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche von $273,13 \mu\text{m}^2 \pm 9,06$ (Kontrolle) auf $343,78 \mu\text{m}^2 \pm 12,98$. Auch in der 1000 MOI Ad-GFP infizierten Gruppe kam es nach Induktion durch PE zur signifikanten Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche von $284,62 \mu\text{m}^2 \pm 10,74$ auf $345,96 \mu\text{m}^2 \pm 12,76$. In der mit 1000 MOI Ad-YB-1 infizierten

Gruppe dagegen kam es auch nach Inkubation mit PE nicht zu einer Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche ($282,44 \mu\text{m}^2 \pm 11,10$ ohne PE; $283,87 \mu\text{m}^2 \pm 9,79$ mit PE). YB-1 hemmt die durch Phenylephrin induzierte Hypertrophie, hier dargestellt in Form der Zellquerschnittsfläche.

3.4.2 YB-1 hemmt die Steigerung der Proteinbiosyntheserate

Zur Untersuchung der Proteinbiosyntheserate wurden sechs Schalen mit 1000 MOI Ad-YB-1 und weitere sechs Schalen mit 1000 MOI Ad-GFP infiziert. Weitere sechs Schalen dienten als unbehandelte Kontrolle. Nach 24h Infektion wurde allen Schalen radioaktiv markiertes Phenylalanin zugegeben und bei jeweils drei Schalen wurde zusätzlich die Hypertrophie mit PE stimuliert (siehe Abbildung 2.10). Weitere 24h später wurde die Proteinbiosyntheserate bestimmt (siehe Abbildung 3.30).

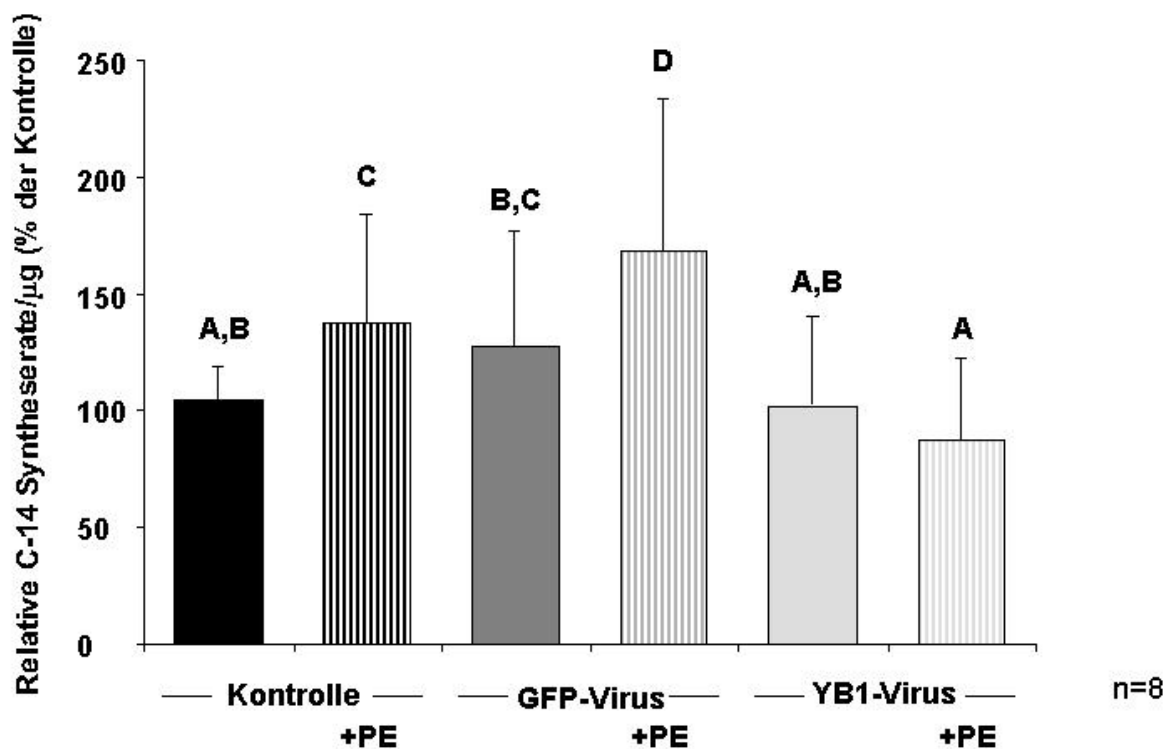


Abbildung 3.30: Relative Proteinbiosyntheserate nach 24h Infektion mit 1000 MOI Ad-GFP und 1000 MOI Ad-YB-1, nach 24h Hypertrophieinduktion mit $10 \mu\text{M}$ PE. Dargestellt sind der Mittelwert aus acht Versuchsansätzen und die zugehörige Standardabweichung. Signifikant unterschiedliche Gruppen sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet.

Bei der Kontrollgruppe kam es nach Induktion mit PE zu einer signifikanten Erhöhung der relativen C-14 Syntheserate von $1,04 \pm 0,15$ (Kontrolle) auf $1,38 \pm 0,47$ (Kontrolle + PE). Auch nach Infektion mit 1000 MOI Ad-GFP kam es nach Induktion durch PE

zur signifikanten Erhöhung der relativen C-14 Syntheserate von $1,28 \pm 0,49$ auf $1,68 \pm 0,65$.

Nach Infektion mit 1000 MOI Ad-YB-1 blieb diese durch PE ausgelöste Hypertrophie aus ($1,02 \pm 0,38$ ohne PE; $0,87 \pm 0,35$ mit PE).

Demzufolge konnte auch bei der Proteinbiosyntheserate der hemmende Effekt von YB-1 auf die Phenylephrin induzierte Hypertrophie nachgewiesen werden.

3.5 Keine Beeinflussung von Apoptose und Nekrose durch die Viren

Um sicherzugehen, dass die hergestellten Viren nicht schon von sich aus einen negativen Einfluss auf Apoptose und Nekrose haben, wurde eine Schale mit Herzmuskelzellen für 24h und eine für 48h mit 1000 MOI Ad-YB-1 infiziert. Eine weitere wurde für 24h und eine für 48h mit 1000 MOI Ad-GFP infiziert. Zwei Schalen dienten nach 24h, beziehungsweise 48h als unbehandelte Kontrollen. Nach der entsprechenden Zeit wurden die Zellen mit einem Hoe-Assay hinsichtlich Apoptose und Nekrose untersucht.

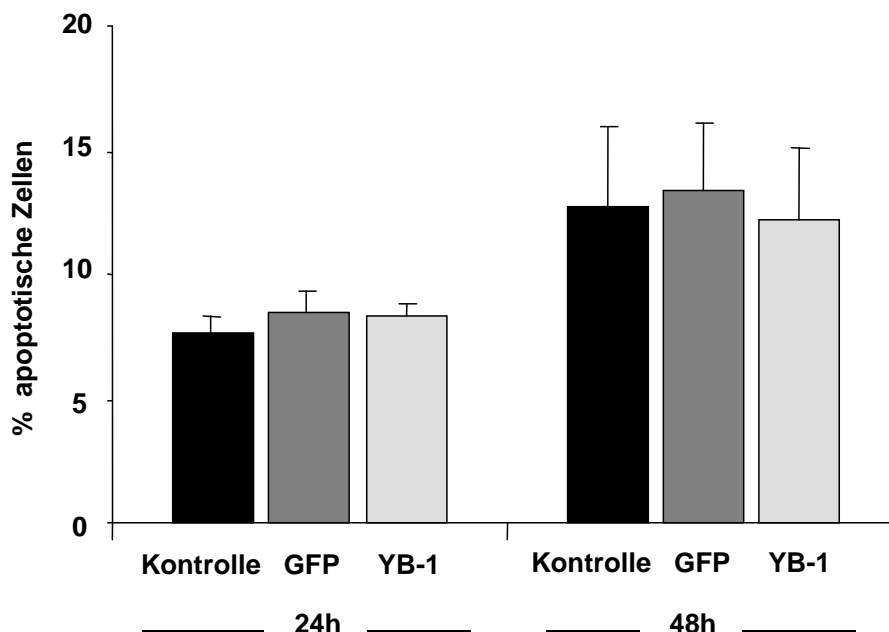


Abbildung 3.31: Auswertung des Hoe-Assays. Apoptose 24h und 48h nach Infektion mit 1000 MOI Ad-YB-1 und 1000 MOI Ad-GFP. Dargestellt sind der Mittelwerte aus zehn (24h) bzw. sieben Versuchsansätzen (48h) und der Standardfehler des Mittelwertes.

Nach 24h sind keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Apoptose zwischen der Kontrollgruppe ($7,54\% \pm 0,80$), nach Infektion mit 1000 MOI Ad-GFP ($8,41\% \pm 0,91$) und nach Infektion mit 1000 MOI Ad-YB-1 ($8,23\% \pm 0,56$) zu sehen. Nach 48h ist in allen drei Gruppen eine deutliche Steigerung der Apoptoserate gegenüber 24h zu sehen. Zwischen der Kontrollgruppe ($12,78\% \pm 3,19$), Infektion mit 1000 MOI Ad-GFP ($13,31\% \pm 2,79$) und Infektion mit 1000 MOI Ad-YB-1 ($12,26\% \pm 2,81$) sind aber auch nach 48h keine signifikanten Unterschiede zu sehen.

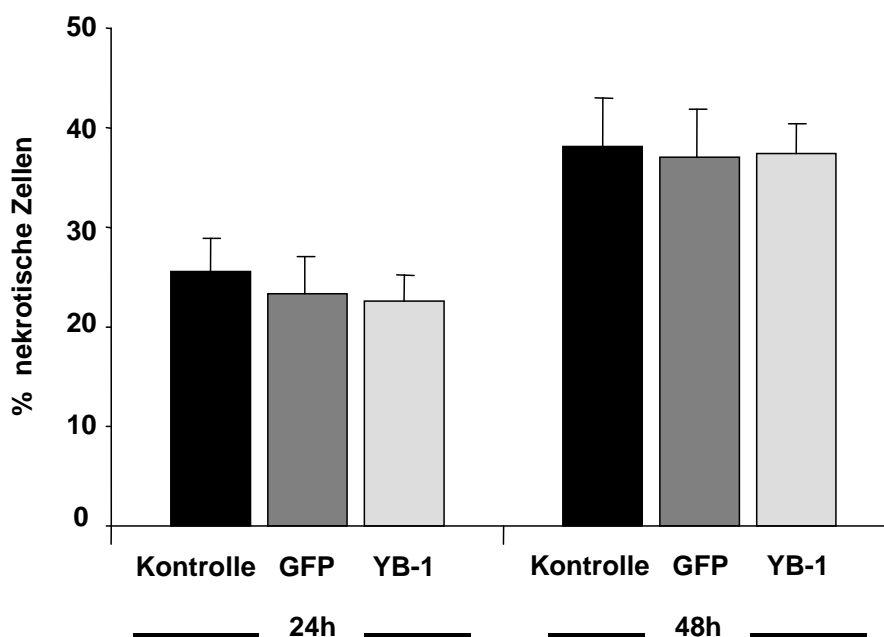


Abbildung 3.32: Auswertung des Hoe-Assays. Nekrose 24h und 48h nach Infektion mit 1000 MOI Ad-YB-1 und 1000 MOI Ad-GFP. Dargestellt sind der Mittelwerte aus zehn (24h) bzw. sieben Versuchsansätzen (48h) und der Standardfehler des Mittelwertes.

Bei der Anzahl der nekrotischen Zellen zeigt sich ein ganz ähnliches Bild, wie bei der Anzahl der Apoptotischen. Nach 24h sind keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl nekrotischer Zellen zwischen der Kontrollgruppe ($25,49\% \pm 3,40$), nach Infektion mit 1000 MOI Ad-GFP ($23,33\% \pm 3,70$) und nach Infektion mit 1000 MOI Ad-YB-1 ($22,71\% \pm 2,62$) zu sehen. Nach 48h ist sowohl bei der Kontrollgruppe ($38,20\% \pm 4,92$), als auch nach Infektion mit 1000 MOI Ad-GFP ($36,90\% \pm 4,90$) und nach Infektion mit 1000 MOI Ad-YB-1 ($37,35\% \pm 2,88$) eine deutliche Steigerung der Nekroserate zu erkennen. Zwischen den drei Gruppen sind keine signifikanten Unterschiede zu sehen.

Es konnte also sowohl nach 24h als auch nach 48h kein Einfluss der generierten Viren Ad-YB-1 und Ad-GFP auf Apoptose und Nekrose festgestellt werden. Deutlich zu sehen ist aber, dass sowohl Apoptose als auch Nekrose mit steigender Kulturdauer der Kardiomyozyten deutlich zunehmen.

3.6 YB-1 hemmt die $\text{TGF}\beta_1$ induzierte Apoptose

3.6.1 Hemmung der frühen Apoptosevorgänge

Für diesen Apoptose-Nachweis wurden zwei Schalen mit Herzmuskelzellen mit jeweils 1000 MOI YB-1 Virus infiziert. Zwei weitere Schalen dienten als nicht infizierte Kontrolle. Die Apoptose-Induktion mit 1 ng/ml $\text{TGF}\beta_1$ erfolgte nach siebenstündiger Infektion bei je einer infizierten und einer nichtinfizierten Schale. Vier Stunden später wurde die Annexin-/Propidiumiodid-Färbung durchgeführt um damit die Verlagerung von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Aussenseite der Zellmembran nachzuweisen. Das ist einer der frühesten Apoptosevorgänge.

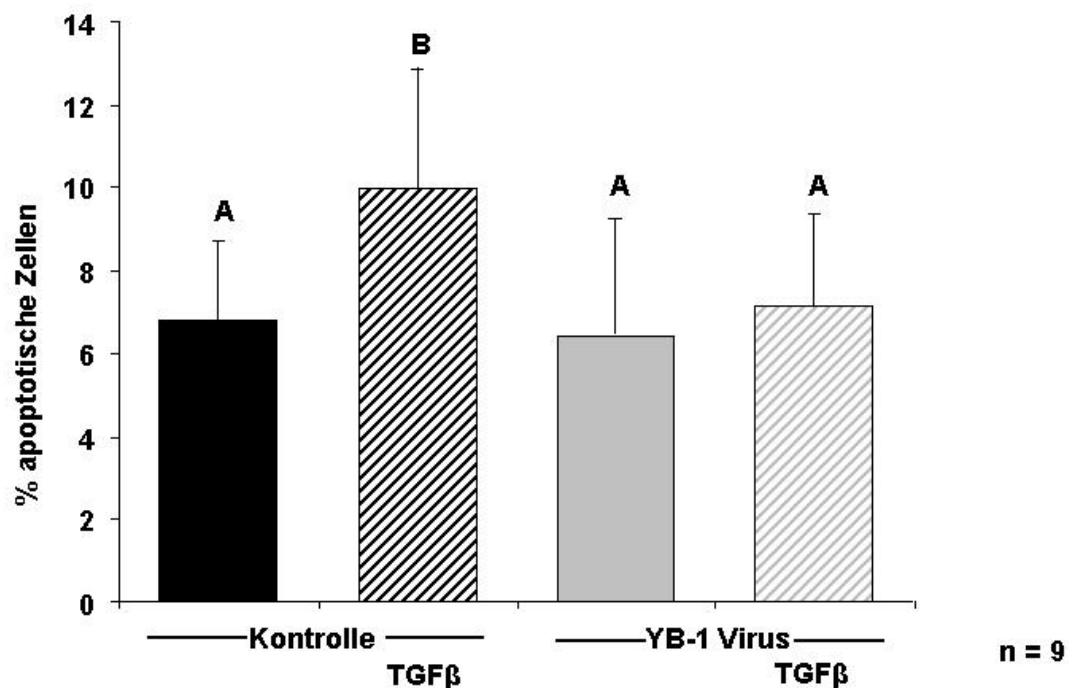


Abbildung 3.33: Auswertung des Annexin-Assays. Apoptose nach 7h Infektion mit 1000 MOI Ad-YB-1 und nach 4h Apoptose-Induktion mit $\text{TGF}\beta_1$. Dargestellt sind der Mittelwert aus neun Versuchsansätzen und die zugehörige Standardabweichung. Signifikant unterschiedliche Gruppen sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet.

Auf die Infektion mit dem Kontrollvirus Ad-GFP wurde in diesem Versuchsansatz verzichtet, da die Grünfluoreszenz von GFP im selben Spektrum liegt wie die Fluoreszenz von Annexin V-FITC und der Assay dadurch nicht auswertbar gewesen wäre.

In Abbildung 3.33 ist das Ergebnis dieses Annexin Assays dargestellt. Bei der Kontrollgruppe kommt es zu einer signifikant gesteigerten Apoptose von $6,80\% \pm 1,90$ auf $9,98\% \pm 2,91$ unter $\text{TGF}\beta_1$ Stimulation. Bei den Zellen, die mit Ad-YB-1 infiziert wurden, bleibt diese Apoptose-Induktion durch $\text{TGF}\beta_1$ aus ($6,45\% \pm 2,83$ ohne $\text{TGF}\beta_1$; $7,18\% \pm 2,21$ mit $\text{TGF}\beta_1$).

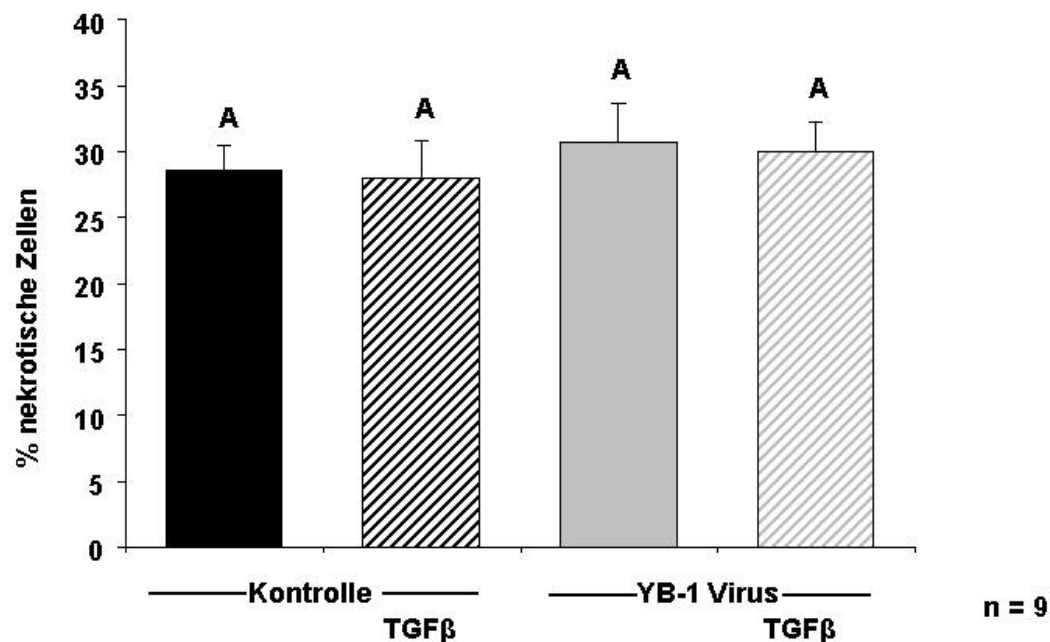


Abbildung 3.34: Auswertung des Annexin-Assays. Nekrose nach 7h Infektion mit 1000 MOI Ad-YB-1 und nach 4h Apoptose-Induktion mit $\text{TGF}\beta_1$. Dargestellt sind der Mittelwert aus neun Versuchsansätzen und die zugehörige Standardabweichung. Signifikant unterschiedliche Gruppen sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet.

In Abbildung 3.34 ist das Ergebnis hinsichtlich der Anzahl nekrotischer Zellen dargestellt. Es zeigt sich kein Unterschied in der Anzahl nekrotischer Zellen zwischen der Kontrolle ($28,63\% \pm 8,97$), Inkubation mit $\text{TGF}\beta_1$ ($27,99\% \pm 9,93$), Infektion mit Ad-YB-1 ($30,74\% \pm 9,33$) und Infektion mit Ad-YB-1 und Inkubation mit $\text{TGF}\beta_1$ ($30,00\% \pm 13,14$). Es kam weder durch das Virus, noch durch die Stimulation mit $\text{TGF}\beta_1$ zu einer signifikant vermehrten Nekrose.

3.6.2 Hemmung der späten Apoptosevorgänge

Für diesen Apoptose-Nachweis mit Hoe 33258 wurden zwei Schalen mit Herzmuskelzellen mit 1000 MOI Ad-YB-1 infiziert. Zwei Schalen wurden mit 1000 MOI Ad-GFP infiziert. Zwei weitere Schalen dienten als nicht infizierte Kontrolle. Die Apoptose-Induktion mit 1 ng/ml $\text{TGF}\beta_1$ erfolgte nach siebenstündiger Infektion bei je einer Schale pro Gruppe. Zwanzig Stunden später wurde die Hoe 33258/Propidiumiodid-Färbung durchgeführt (siehe Abbildung 3.35). Da mit dem Hoe-Farbstoff die Chromatinkondensation sichtbar gemacht wird, die nach etwa 20 Stunden einsetzt, lassen sich so die späten Apoptosevorgänge nachweisen.

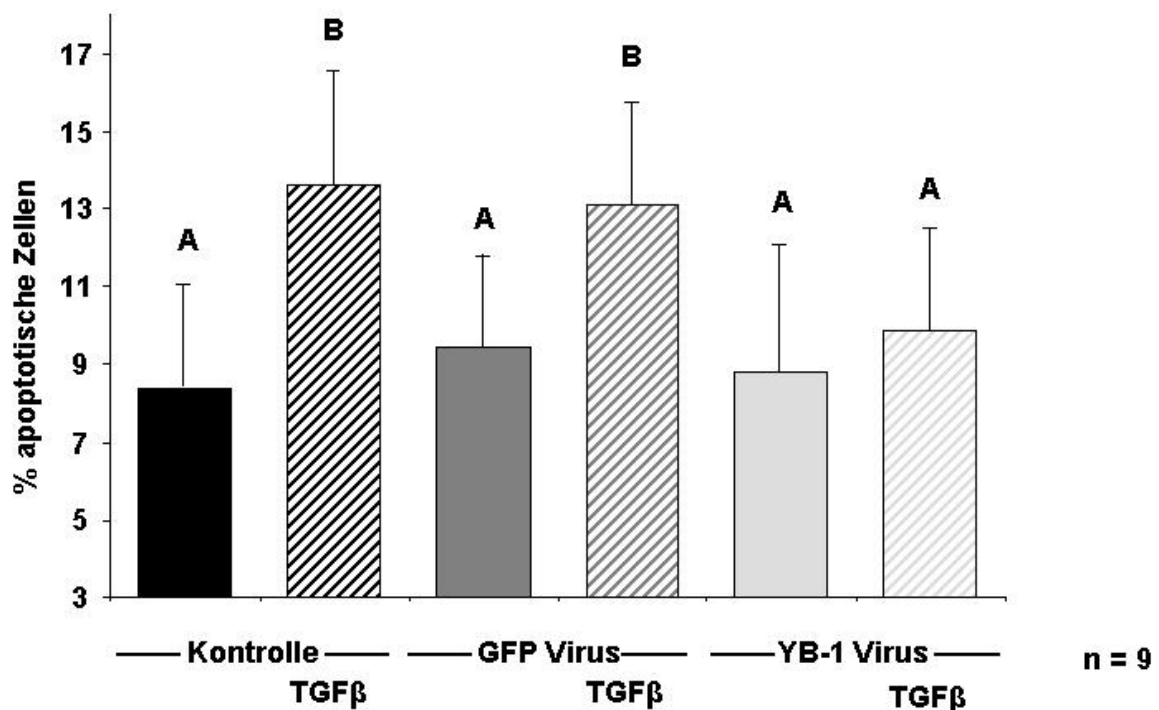


Abbildung 3.35: Auswertung des Hoe Assays. Apoptose nach 7h Infektion mit 1000 MOI Ad-GFP und 1000 MOI Ad-YB-1 und nach 20h Apoptose-Induktion mit $\text{TGF}\beta_1$. Dargestellt sind der Mittelwert aus neun Versuchsansätzen und der zugehörige Standardfehler des Mittelwertes. Signifikant unterschiedliche Gruppen sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet.

Nach Apoptose-Induktion mit $\text{TGF}\beta_1$ kam es zu einer signifikanten Steigerung der Apoptose von $8,61\% \pm 0,91$ (Kontrolle) auf $13,04\% \pm 1,36$. Auch nach Infektion mit 1000 MOI Ad-GFP kam es nach $\text{TGF}\beta_1$ Induktion zur Steigerung der Apoptose von $9,41\% \pm 1,21$ auf $12,80\% \pm 1,28$. Nach Infektion mit 1000 MOI Ad-YB-1 blieb diese

Apoptose-Induktion durch $\text{TGF}\beta_1$ aus ($9,22\% \pm 1,09$ ohne $\text{TGF}\beta_1$; $9,50\% \pm 1,10$ mit $\text{TGF}\beta_1$).

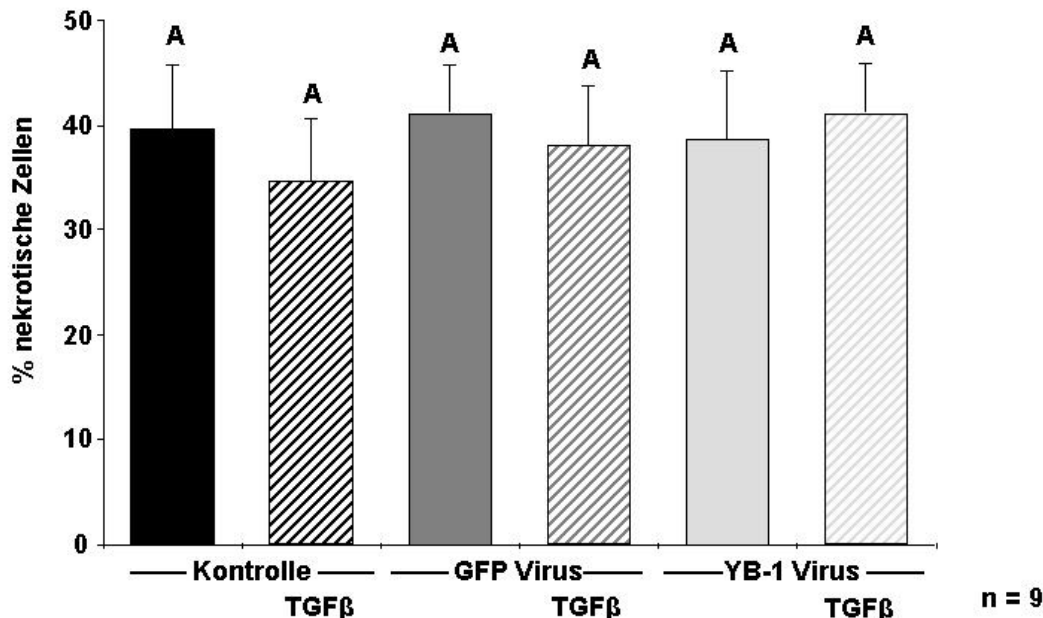


Abbildung 3.36: Auswertung des Hoe Assays. Nekrose nach 7h Infektion mit 1000 MOI Ad-GFP und 1000 MOI Ad-YB-1 und nach 20h Apoptose-Induktion mit $\text{TGF}\beta_1$. Dargestellt sind die Mittelwerte aus neun Versuchsansätzen und der zugehörige Standardfehler des Mittelwertes. Signifikant unterschiedliche Gruppen sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet.

In Abbildung 3.36 ist die Anzahl an nekrotischen Zellen in den unterschiedlichen Gruppen dargestellt. Es zeigten sich dabei keine Unterschiede in der Anzahl nekrotischer Zellen zwischen der Kontrolle ($42,26\% \pm 5,36$), Inkubation mit $\text{TGF}\beta_1$ ($37,66\% \pm 4,94$), Infektion mit Ad-GFP ($43,44\% \pm 3,80$), Infektion mit Ad-GFP und Inkubation mit $\text{TGF}\beta_1$ ($40,57\% \pm 4,81$), Infektion mit Ad-YB-1 ($41,15\% \pm 5,98$) und Infektion mit Ad-YB-1 und Inkubation mit $\text{TGF}\beta_1$ ($43,79\% \pm 3,80$).

Es zeigte sich bei diesem Versuch, dass durch YB-1 die für die Spätphase der Apoptose typische und durch $\text{TGF}\beta_1$ induzierte Chromatinkondensation in den Kernen gehemmt wird.

3.7 YB-1 hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der SMAD Proteine

Nachdem nun ein hemmender Effekt von YB-1 auf die $\text{TGF}\beta_1$ induzierte Apoptose in Herzmuskelzellen nachgewiesen war, stellte sich die Frage, auf welchem Weg diese

Hemmung stattfindet. In der TGF β_1 Signalkaskade ist der erste Schritt, der zur Apoptose führt, die Phosphorylierung der Rezeptor-SMADs SMAD 2 und SMAD 3 (siehe Abbildung 1.2)

Um nun nachzuvollziehen, ob der Apoptose hemmende Effekt von YB-1 in der Hemmung dieser Phosphorylierung von SMAD 2 und SMAD 3 liegt, wurden zwei Schalen mit Herzmuskelzellen für 24h mit 1000 MOI Ad-YB-1 und zwei Schalen für 24h mit 1000 MOI Ad-GFP infiziert. Zwei weitere Schalen dienten als unbehandelte Kontrolle. Danach wurden jeweils eine Schale pro Gruppe mit 1 ng/ml TGF β_1 stimuliert und nach zwei Stunden wurde aus allen Versuchsansätzen das Gesamtprotein isoliert. Danach wurde ein Western Blot mit Antikörpern gegen Phospho-SMAD 2 und Phospho-SMAD 1,3 durchgeführt.

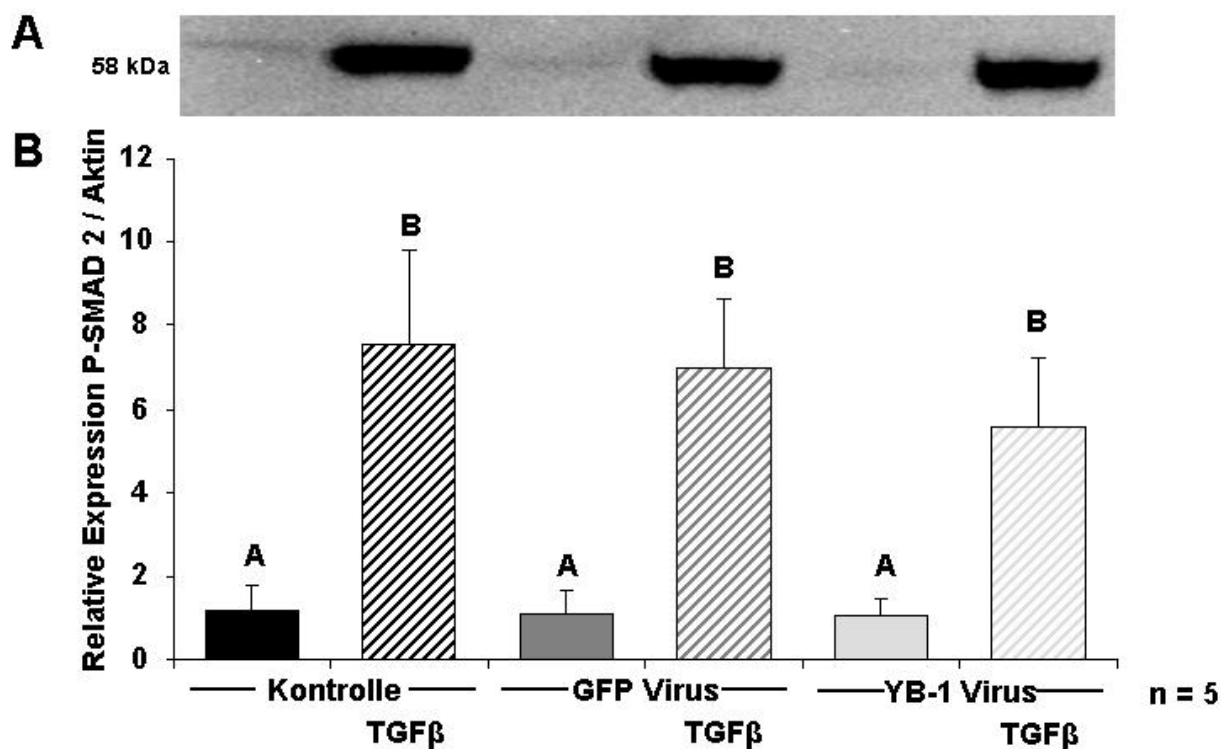


Abbildung 3.37:

(A) Repräsentativer Western Blot mit P-SMAD 2 Antikörpern

(B) Relative Expression von P-SMAD 2 nach 24h Infektion mit 1000 MOI Ad-YB-1 und 1000 MOI Ad-GFP und nach 2h Induktion mit TGF β_1 . Western Blot aus Gesamtprotein normiert auf Aktin Banden. Dargestellt ist der Mittelwert aus fünf Versuchsansätzen und die zugehörige Standardabweichung. Signifikant unterschiedliche Gruppen sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet.

Nach Induktion mit TGF β_1 zeigte sich in allen drei Gruppen eine signifikante Steigerung der SMAD 2 Phosphorylierung (siehe Abbildung 3.37). Bei der Kontrolle

kam es zu einer Steigerung von $1,20 \pm 0,61$ auf $7,51 \pm 2,31$; nach Infektion mit Ad-GFP von $1,09 \pm 0,59$ auf $6,98 \pm 1,65$ und nach Infektion mit Ad-YB-1 von $1,03 \pm 0,40$ auf $5,57 \pm 1,59$.

Durch die Überexpression von YB-1 wurde demzufolge die $\text{TGF}\beta_1$ induzierte Phosphorylierung von SMAD 2 nicht beeinflusst.

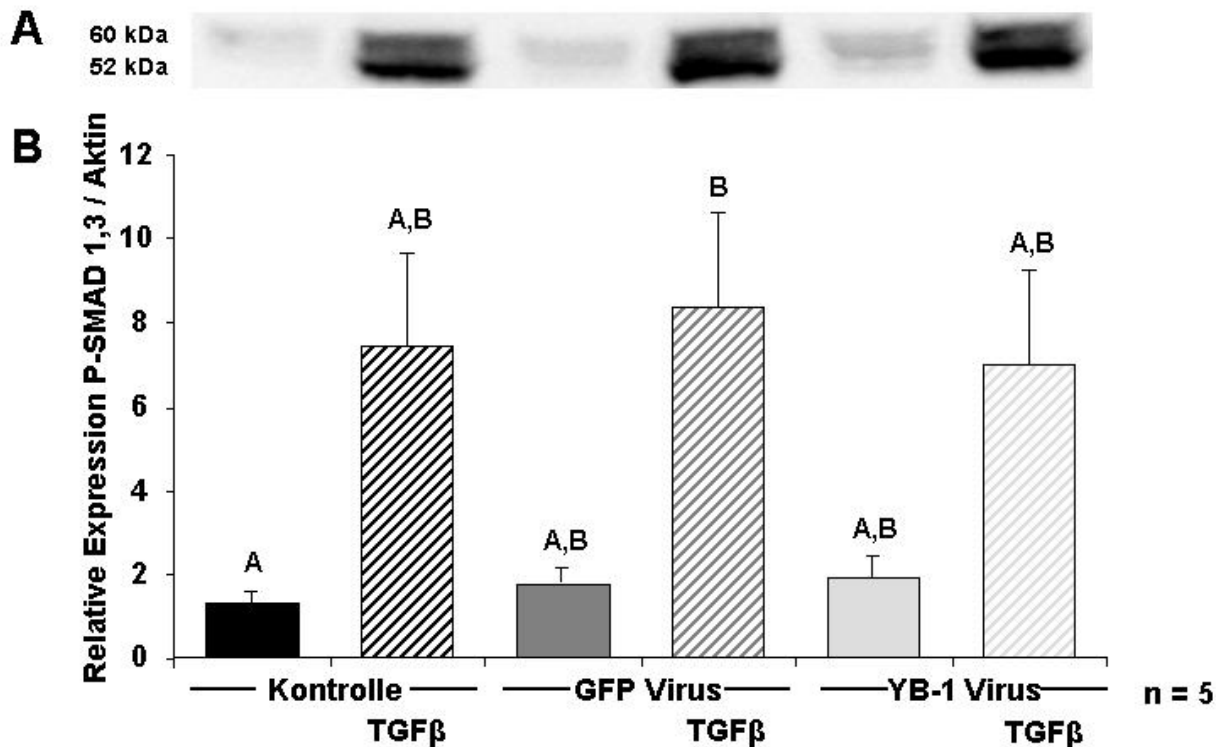


Abbildung 3.38:

(A) Repräsentativer Western Blot mit P-SMAD 1,3 Antikörpern. Ausgewertet wurde die Doppelbande.

(B) Relative Expression von P-SMAD 1,3 nach 24h Infektion mit 1000 MOI Ad-YB-1 und 1000 MOI Ad-GFP und nach 2h Induktion mit $\text{TGF}\beta_1$. Western Blot aus Gesamtprotein normiert auf Aktin Banden. Dargestellt ist der Mittelwert aus fünf Versuchsansätzen und die zugehörige Standardabweichung. Signifikant unterschiedliche Gruppen sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet.

Nach Induktion mit $\text{TGF}\beta_1$ kam es in allen drei Gruppen zu einer Steigerung der SMAD 1,3 Phosphorylierung (siehe Abbildung 3.38). Bei der Kontrolle kam es zu einer Steigerung der Phosphorylierung von $1,32 \pm 0,60$ auf $7,62 \pm 5,01$; nach Infektion mit Ad-GFP kam es zu einer Steigerung von $1,79 \pm 0,94$ auf $8,54 \pm 5,24$ und nach Infektion mit Ad-YB-1 kam es zu einer Steigerung von $1,93 \pm 1,15$ auf $7,16 \pm 5,12$.

Ergebnisse

Durch die Überexpression von YB-1 wurde demzufolge die $\text{TGF}\beta_1$ induzierte Phosphorylierung von SMAD 1,3 nicht beeinflusst.

Nachdem nun nachgewiesen war, dass die Phosphorylierung von SMAD 2 und SMAD 1,3 durch YB-1 nicht beeinflusst wurde, stellte sich die Frage, ob YB-1 möglicherweise einen Einfluss auf die Phosphorylierung von SMAD 1 und SMAD 5 hat. Diese Phosphorylierung von SMAD 1 und SMAD 5 wird zwar normalerweise über BMP, einem anderen $\text{TGF}\beta$ -Familienmitglied, reguliert und nur in einem geringen Maß von $\text{TGF}\beta_1$, dennoch wäre eine Hemmung dieses Rezeptorweges eine mögliche Erklärung für die Hemmung der Apoptose.

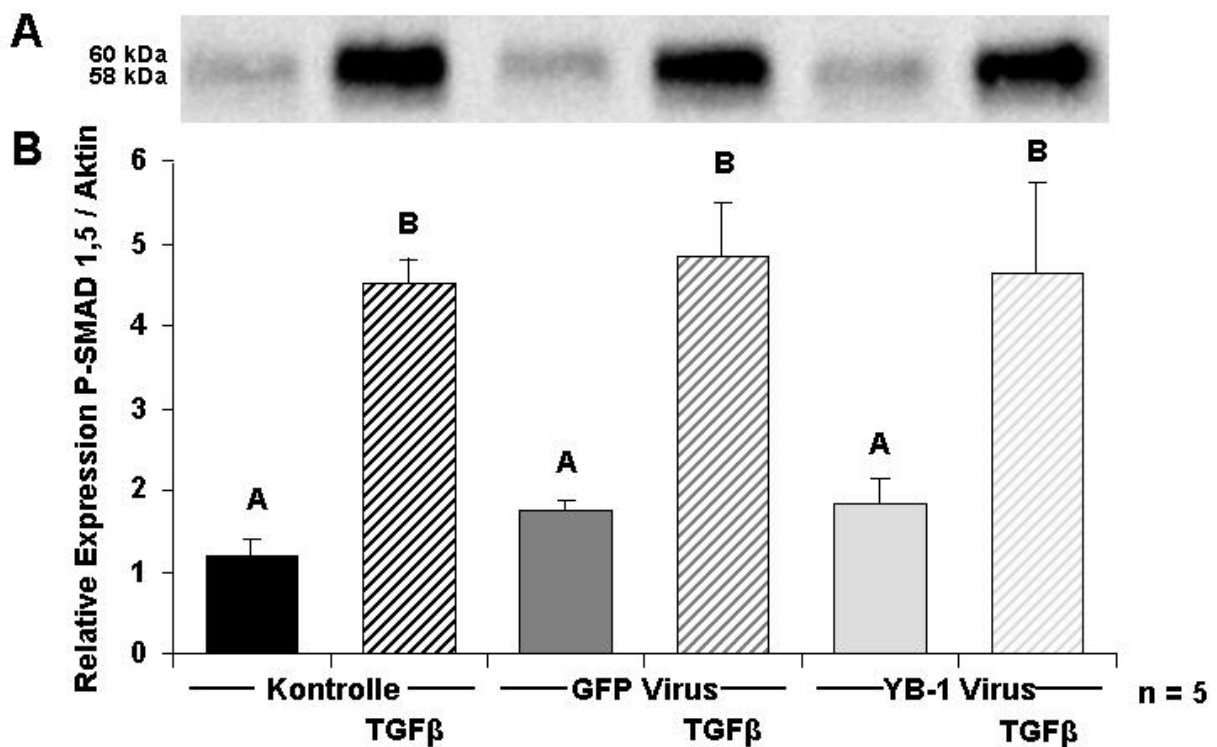


Abbildung 3.39:

(A) Repräsentativer Western Blot mit P-SMAD 1,5 Antikörpern

(B) Relative Expression von P-SMAD 1,5 nach 24h mit 1000 MOI Ad-YB-1 und 1000 MOI Ad-GFP und nach 2h Induktion mit $\text{TGF}\beta_1$. Western Blot aus Gesamtprotein normiert auf Aktin Banden. Dargestellt ist der Mittelwert aus fünf Versuchsansätzen und die zugehörige Standardabweichung. Signifikant unterschiedliche Gruppen sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet

Nach Induktion mit $\text{TGF}\beta_1$ kam es in allen drei Gruppen zu einer signifikanten Steigerung der SMAD 1,5 Phosphorylierung (siehe Abbildung 3.39). Bei der Kontrolle zeigte sich eine Steigerung von $1,20 \pm 0,20$ auf $4,62 \pm 0,31$; nach Infektion mit

Ad-GFP von $1,79 \pm 0,15$ auf $5,26 \pm 0,64$ und nach Infektion mit Ad-YB-1 von $1,95 \pm 0,31$ auf $5,00 \pm 1,11$.

Es kam in diesem Versuch durch die Stimulation mit $\text{TGF}\beta_1$ zu einer Phosphorylierung von SMAD 1 und SMAD 5. Diese Phosphorylierung war durch eine Überexpression von YB-1 nicht beeinflussbar.

3.8 YB-1 beeinflusst nicht die Expression von SMAD 7

Um zu untersuchen, ob die hemmende Wirkung von YB-1 durch eine vermehrte Expression des inhibitorischen SMAD 7 Proteins ausgelöst wird, wurden Herzmuskelzellen für 6h, 12h, 18h und 24h mit 1000 MOI Ad-YB-1 Virus infiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die 24h mit 1000 MOI Ad-GFP Virus infiziert wurden, sowie unbehandelte Zellen. Nach der entsprechenden Zeit wurde die RNA aus den Zellen isoliert und nach DNase Verdau in cDNA umgeschrieben. Danach folgte eine Realtime PCR mit den Primern für SMAD 7 und HPRT als Housekeeping Gen zum Nachweis der relativen SMAD 7 RNA Menge (siehe Abbildung 3.25).

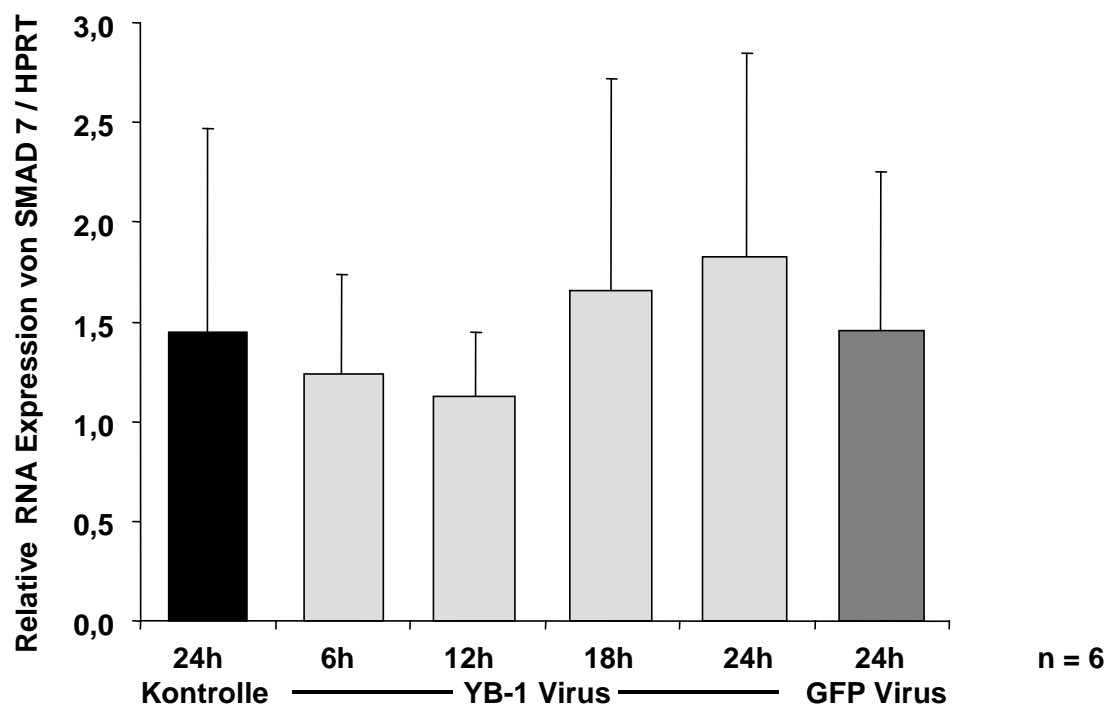


Abbildung 3.40: Relative mRNA Expression von SMAD 7 in einer quantifizierten Realtime PCR. Infektion der Zellen mit 1000 MOI Ad-YB-1 für 6h, 12h, 18h und 24h sowie 1000 MOI Ad-GFP für 24h. Isolation von Gesamt RNA und Herstellung von cDNA. Die Realtime PCR ist normiert auf HPRT. Dargestellt ist der Mittelwert aus sechs Versuchsansätzen und die zugehörige Standardabweichung.

Ergebnisse

Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. In der Kontrollgruppe ergab sich eine relative Expression von SMAD 7 von $1,44 \pm 1,03$. Nach 6h Infektion mit 1000 MOI Ad-YB-1 lag die relative Expression von SMAD 7 bei $1,24 \pm 0,51$; nach 12h bei $1,13 \pm 0,32$; nach 18h bei $1,65 \pm 1,06$ und nach 24h bei $1,82 \pm 1,02$. Eine Infektion für 24h mit 1000 MOI Ad-GFP ergab eine relative SMAD 7 Expression von $1,46 \pm 0,79$. YB-1 hat demzufolge in Herzmuskelzellen keinen Einfluss auf die relative Expression des inhibitorisch wirkenden SMAD 7.

4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte durch eine adenovirale Überexpression in adulten isolierten Kardiomyozyten der Ratte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor YB-1 sowohl die adrenerg induzierte Hypertrophie als auch die durch TGF β ₁-induzierte Apoptose signifikant hemmen kann. Es handelt sich um den ersten Nachweis dieser Hemmung in adulten Kardiomyozyten.

4.1 Adenovirale Überexpression von YB-1

Um die funktionellen Eigenschaften der hergestellten Viren zu untersuchen, wurde deren Einfluss auf Apoptose und Nekrose vergleichend mit einer unbehandelten Negativkontrolle untersucht. Dabei zeigte sich nach einer Infektion der Kardiomyozyten mit 1000 MOI Ad-YB-1 Virus sowohl nach 24h, als auch nach 48h keine negative Auswirkung hinsichtlich einer gesteigerten Nekroserate beider Viren gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Das steht in einem gewissen Widerspruch zu der Arbeit von Glockzin *et al* (2006), in der nachgewiesen wurde, dass ein dort genutztes Adenovirus Ad-YB-1* zu einer gesteigerten Zellzerstörung führt. Allerdings wurden diese Versuche mit HEK293 Zellen, sowie verschiedenen Tumorzelllinien U2OS (humanes Osteosarkom), HeLa Zellen (humanes Zervixkarzinom) und A549 (humanes Lungenkarzinom) durchgeführt (Glockzin *et al.*, 2006). Dabei kam es nach Infektion mit Ad-YB-1* (10 und 50 pfu/Zelle) in A549 und U2OS Zellen zu einer deutlich schnelleren DNA-Replikation des Virus, als bei Versuchen mit einem Kontrollvirus. Des Weiteren zeigte sich dabei ein starker cytopathischer Effekt (CPE) im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings wurde dieser CPE nach 5 tägiger Kultur nachgewiesen, während die Kardiomyozyten in der vorliegenden Studie für maximal 48h in Kultur gehalten wurden. Des Weiteren wurde in der Studie von Glockzin *et al.* nachgewiesen, dass eine Infektion mit Ad-YB-1 zwar zu einer gesteigerten Phosphatidyl-Externalisierung führte, es jedoch ansonsten nicht zu einer vermehrten Apoptose kam. In der hier vorliegenden Arbeit an Herzmuskelzellen konnte weder eine gesteigerte Phosphatidyl-Externalisierung, noch eine vermehrte Apoptose nach 24h und 48h im Vergleich zu einem Kontrollvirus Ad-GFP und einer unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden.

Die deutlichen Unterschiede hinsichtlich Apoptose und Nekroseentstehung in der Studie von Glockzin *et al.* und der hier vorliegenden Arbeit lassen sich vor allem durch die Verwendung von unterschiedlichen Zelltypen begründen. Bei den hier verwendeten Herzmuskelzellen kommt es weder zu einer Virusvermehrung noch zu einem cytopathischen Effekt, da das verwendete Adenovirus durch die Deletion der E1 und E3 Genkassette replikationsgehemmt ist. In den von Glockzin *et al.* verwendeten HEK 293 Zellen wird diese Replikationshemmung dagegen durch zelleigene Gene ausgeglichen. Bei den Tumorzellen, die diese verwendet haben, handelt es sich im Gegensatz zu den hier verwendeten Kardiomyozyten um entartete, sich schnell teilende Zellen, so dass die Ursache für den dort beobachteten cytopathischen Effekt im Zusammenhang mit YB-1 entweder im Prozess der Zellteilung oder einem generell veränderten Stoffwechsel bei Tumorzellen zu suchen ist.

Für Herzmuskelzellen wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass eine Infektion mit dem im Rahmen dieser Arbeit generierten Virus Ad-YB-1 per se keinen Einfluss auf Apoptose oder Nekrose hat.

4.2 Verteilung von YB-1 in der Herzmuskelzelle

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Miwa *et al.* (2006), die in adulten Wildtyp-Mäusen *in vivo* kaum noch YB-1 nachweisen konnten, war in der hier vorliegenden Arbeit bei adulten isolierten Kardiomyozyten *in vitro* auch bei der unbehandelten Kontrolle ein deutliches strukturiertes zytoplasmatisches Signal zu verzeichnen. Dabei ist YB-1 scheinbar an das Zytoskelett der Herzmuskelzelle gebunden. Kojic *et al.* (2004) haben *in vivo* und *in vitro* eine solche Bindung an das Zytoskelett nachgewiesen. Dabei bindet YB-1 sowohl an das Protein CARP, welches an das Z-Scheiben Protein Myopalladin (Bang *et al.*, 2001) bindet, als auch an das Protein Ankrd2, welches an das Z-Scheiben Protein Telethonin bindet. Beide Proteine werden im Ventrikel adulter Herzen exprimiert, aus denen die hier verwendeten Herzmuskelzellen gewonnen wurden. Möglicherweise liegt in Herzmuskelzellen auch zusätzlich eine direkte Bindung an Aktin vor, wie sie von Ruzanov *et al.* (1999) für YB-1 in HeLa Zellen nachgewiesen wurde.

Die subzelluläre Lokalisation von YB-1 zeigt zelltypspezifische Unterschiede bei Tumorzellen und proliferierenden Zellen *in vitro* gegenüber nicht-transformierten

Zellen *in vivo*. In sämtlichen untersuchten proliferierenden Zellen *in vitro* ist YB-1 zytoplasmatisch zu finden (Knott, 2008). Das YB-1 Protein kann dabei auch zellzyklusabhängig seine Lokalisation ändern. Während des Übergangs von der G₁-Phase in die S- Phase transloziert YB-1 in den Zellkern und relokalisiert in das Zytoplasma in der späten S-Phase (Jürchott *et al.*, 2003). Auch ist eine nukleäre Translokation von YB-1 in zellulären Stresssituationen wie UV-Bestrahlung (Koike *et al.*, 1997) oder Hyperthermie (Stein *et al.*, 2001) beschrieben. Eine gleichartige nukleäre YB-1-Translokation wurde nach Behandlung mit Interferon (IFN)- γ und TGF β beobachtet (Higashi *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der für 30h mit Ad-YB-1 infizierten Gruppe eine deutliche Überexpression von YB-1 im Zytoplasma. Eine vermehrte Expression im Kern konnte nicht nachgewiesen werden. Auch das ist ein Unterschied zu den Versuchen von Glockzin *et al.* (2006), die nach Überexpression von YB-1 durch ein Adenovirus Ad-YB-1* eine deutliche Kernakkumulation von exogenem YB-1 im Zellkern von HeLa Zellen nachweisen konnten. Im Gegensatz zu isolierten Kardiomyozyten handelt es sich dabei aber um höchst teilungsaktive Zellen. Da Herzmuskelzellen allerdings fast ausschließlich in der G₀ Phase vorliegen, findet der entscheidende Übergang von G₁ in die S Phase bei ihnen nicht statt und dementsprechend kann in diesen Zellen die zellzyklusabhängige Kernakkumulierung, wie sie von Jürchott *et al.* (2003) nachgewiesen wurde, auch nicht stattfinden.

4.3 YB-1 und Apoptose

In der hier vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal *in vitro* nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von YB-1 in Herzmuskelzellen zu einer Hemmung der durch TGF β_1 induzierten Apoptose führt. Ein hemmender Einfluss von YB-1 auf die Entstehung einer Apoptose ist in anderen Zelltypen bereits nachgewiesen worden. Die Expression von YB-1 ist in Tumorzellen hochreguliert, etwa bei Brustkrebs (Bargou *et al.*, 1997), bei humanem Osteosarkom (Oda *et al.*, 1998), kolorektalem Karzinom (Shibao *et al.*, 1999), serösem Ovarial-Adenokarzinom (Kamura *et al.*, 1999), Malignem Melanom (Hipfel *et al.*, 2000) und Nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (Shibahara *et al.*, 2001). Diese erhöhte Expression von YB-1 in den Tumorzellen ist möglicherweise eine Ursache für das Ausbleiben der Apoptose in metastatischem

Gewebe. Schittek *et al.* (2007) zeigten, dass die Suppression von YB-1 zu einer größeren Anzahl an apoptotischen Zellen in metastatischen Melanomzellen führte.

Auch andere antiapoptotische Funktionen von YB-1 sind entdeckt worden, so reguliert YB-1 beispielsweise in B-Lymphozyten das pro-apoptotische Gen fas herunter (Lasham *et al.*, 2000) und umgekehrt führt eine Inaktivierung von YB-1 in B-Vorläuferzellen zu einer erhöhten spontanen Apoptoserate in den Zellen (Swamynathan *et al.*, 2002).

Das Ergebnis einer durch YB-1 ausgelösten Hemmung der Apoptose-Induktion von TGF β kann dadurch erklärt werden, dass bereits in verschiedenen anderen Zellen direkte Interaktionen von YB-1 mit TGF β nachgewiesen wurden. In Fibroblasten hemmt YB-1 die durch TGF β induzierte Expression des Collagen-Gens COL1A2 (Higashi *et al.*, 2003b). Inagaki *et al.* (2005) konnten den hemmenden Effekt von YB-1 auf die TGF β /SMAD Signalkaskade hinsichtlich der Regulation des Col1A2 Collagen-Gens in der Entstehung einer Leberfibrose nachweisen. In Fibroblasten der Lunge wurde ebenfalls eine Interaktion zwischen TGF β und YB-1 nachgewiesen. TGF β fördert hier die Expression von Kollagen, indem es die Proteinkomplexbildung an einem TGF β -response element am Col1A1 Gen stimuliert und YB-1 ist an diesem Komplex beteiligt. (Sun *et al.*, 2001).

4.4 YB-1 und SMADs

Um zu untersuchen, auf welchem Wege die Hemmung der TGF β_1 induzierten Apoptose durch YB-1 stattfindet, wurde die relative Expression von SMAD 7 auf RNA Ebene untersucht. Dooley *et al.* (2006) haben in hepatischen Kupferschen Sternzellen, hepatozellulären Karzinomzellen (HepG2), in humanen Fibrosarkom-Zellen und humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) nachgewiesen, dass YB-1 die Expression des inhibitorischen SMAD 7 sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene steigert. In den Herzmuskelzellen konnte eine derartige Steigerung von SMAD 7 auf RNA-Ebene nicht bestätigt werden.

Da SMAD 7 auf der Stufe der Phosphorylierung von SMAD 2 und 3 hemmend auf die TGF β /SMAD Signalkaskade einwirkt (Nakao *et al.*, 1997) (siehe Abbildung 1.3), wurde auch diese untersucht. Trotz einer 24h Infektion mit Ad-YB-1 kam es nicht zu einer Hemmung der Phosphorylierung von SMAD 2 und 3. Dementsprechend kommt

es auch nach Überexpression von YB-1 zu einem normalen Anlaufen des TGF β /SMAD-Signalweges mit einer Aktivierung von SMAD 2 und 3 durch Phosphorylierung. Das stimmt mit der vorher beschriebenen fehlenden Expressionssteigerung von SMAD 7 in Kardiomyozyten durch YB-1 überein. In Herzmuskelzellen ist der Mechanismus der Hemmung von TGF β durch YB-1 also grundsätzlich ein anderer, als in den von Dooley *et al.* (2006) untersuchten Zellen.

Um auszuschließen, dass es zu einer Rekrutierung anderer SMAD Proteine in der Herzmuskelzelle kommt, und die beobachtete Wirkung von YB-1 auf einer Hemmung von diesen beruht, wurde auch die Wirkung von YB-1 auf die Phosphorylierung von SMAD 1 und 5 untersucht. Der klassische Weg der TGF β /SMAD/Apoptose-Signalkaskade läuft zwar über SMAD 2 und 3, es können aber auch SMAD 1 und 5 aktiviert werden. So kam es tatsächlich nach Inkubation mit TGF β_1 zu einer Phosphorylierung von SMAD 1,5 in allen Gruppen, die Überexpression von YB-1 hatte darauf jedoch keinen Einfluss.

Die durch die Überexpression von YB-1 erzielte Hemmung der Apoptose muss also an einem späteren Zeitpunkt in der TGF β /SMAD-Signalkaskade einsetzen. Welcher Mechanismus ihr zugrunde liegt, bleibt momentan noch offen und bedarf weiterer Untersuchungen. Denkbar wäre eine Interaktion von YB-1, SMAD 3 und dem SMAD-bindenden-Element (SBE), wie sie Higashi *et al.* (2003a) in humanen Hautfibroblasten gezeigt haben. Dabei wurde nachgewiesen, dass YB-1 an SMAD 3 bindet und die Interaktion zwischen SMAD3 und p300 verhindert. YB-1 scheint dabei nicht die Bindung von SMAD 3 an das SBE zu hemmen, sondern es kommt zu einem SMAD/YB-1/SBE Komplex, der antagonistische Eigenschaften zeigt.

4.5 YB-1 und andere Transkriptionsfaktoren

Für AP-1 wurde nachgewiesen, dass es in Zusammenarbeit mit SMAD-Proteinen Apoptose auslöst, wobei hauptsächlich SMAD2/3 und 4 beteiligt sind (Schneiders *et al.*, 2005, Yamamura *et al.*, 2000). Dabei interagieren diese SMADs einmal direkt mit AP-1-Untereinheiten, und zwar mit allen Vertretern der Jun-Familie, Jun B, c-Jun und JunD (Liberati *et al.*, 1999, Schneiders *et al.*, 2004) und außerdem mit der entsprechenden DNA-Bindungsstelle für AP-1. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von AP-1 ist die Affinität von SMADs zu dieser Bindungsstelle allerdings entscheidend

erhöht (Liberati et al., 1999; Yamamura et al., 2000). Interaktionen von YB-1 mit AP-1 sind in anderen Zellen bereits nachgewiesen worden. In HeLa Zellen wurde beispielsweise nachgewiesen, dass YB-1 die AP-1 abhängige Genaktivierung unterdrückt, indem es einerseits AP-1 DNA bindet und andererseits mit dem AP-1 Protein interagiert. So unterdrückt es die mRNA Expression und Promotor-Aktivierung des AP-1 Zielgenes MMP-12 (Samuel *et al.*, 2005). Des weiteren bindet es an die MMP-13 Promotor Sequenz und unterdrückt so die MMP-13 Transaktivierung über die AP-1 Bindungsstelle (Samuel *et al.*, 2007). Eine derartige Interaktion zwischen YB-1 und AP-1 könnte auch in der Herzmuskelzelle im Rahmen einer durch TGF β induzierten Apoptose eine Rolle spielen. Auch eine Komplexbildung aus AP-1, SMAD und YB-1 mit einer daraus resultierenden Hemmung der Apoptose ist denkbar. Zur genaueren Abklärung des Signalweges von YB-1 im Rahmen der Apoptose in der Herzmuskelzelle sind weitere Untersuchungen nötig.

4.6 YB-1 und Hypertrophie

In dieser Arbeit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von YB-1 in isolierten adulten Kardiomyozyten zu einer Hemmung der α_1 -adrenerg induzierten Hypertrophie führt. Dieses Ergebnis lässt sich durch eine Interaktion mit SMAD Proteinen nicht erklären, da diese im Rahmen einer α_1 -adrenerg induzierten Hypertrophie keine Rolle spielen (Schneiders *et al.*, 2005).

Evdokimova *et al.* (1995) zeigten, dass das YB-1 Protein als Hauptbestandteil der zytoplasmatischen Ribonukleoprotein-Komplexe einen wichtigen Regulationsmechanismus der mRNA-Translation darstellt. Dabei destabilisiert YB-1 in niedriger Konzentration die Sekundärstruktur der RNA und macht die mRNA für die 60S-Unterheit der Ribosomen so leichter zugänglich, (Matsumoto & Wolffe, 1998). Das heißt, dass YB-1 in niedriger Konzentration die RNA-Translation stimuliert. Im Gegensatz hierzu wird bei einer hohen cytosolischen YB-1-Konzentration die Translation durch Maskierung der mRNA gehemmt (Evdokimova et al. 2006, Davydova *et al.*, 1997). Eine verminderte Expression von YB-1 führt hingegen ebenfalls zu einer erniedrigten Proliferation (Schitteck et. al. 2007) und eine Inhibition von YB-1 hemmt beispielsweise das Wachstum von sieben verschiedenen

Brustkrebs Zelllinien (Lee *et al.*, 2008). YB-1 scheint somit in physiologischen Grenzen die Hypertrophie zu steigern und eine Abweichung in der Menge von YB-1 nach oben oder unten führt zu einer Hemmung der Hypertrophie. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zur Hypertrophie, wurden die Zellen für 24h mit Ad-YB-1 infiziert, was etwa einer vierfachen Überexpression von YB-1 entspricht. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass diese Überexpression hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist. Dementsprechend könnte es durch die unphysiologisch hohe Menge an YB-1 zu einer Translationshemmung von prohypertrophen Faktoren in der Herzmuskelzelle kommen.

Bader & Vogt (2005) zeigten eine andere Erklärung auf. In Versuchen mit embryonalen Hühnerembryofibroblasten (CEF) fanden sie eine direkte Interaktion von YB-1 mit dem PI3-Kinase/Akt-Signalweg im Zytoplasma. Dabei führte eine Überexpression von YB-1 zu einer Hemmung der durch PI3-Kinase induzierten Transformation und zwar durch eine spezifische Inhibition der Proteinsynthese. Wie Schlüter *et al.* (1998) zeigten, ist dieser PI3-Kinase/Akt-Signalweg von besonderer Bedeutung in der Entstehung einer kardialen Hypertrophie, so dass eine spezifische Hemmung dieser Signalkaskade durch YB-1 ebenfalls eine logische Erklärung für die Reduktion der Proteinsynthese und Hypertrophie durch YB-1 darstellt.

Auch AP-1 spielt eine entscheidende Rolle in der durch Phenylephrin verursachten Hypertrophie. Diese Korrelation zwischen AP-1 und dem Auftreten einer kardialen Hypertrophie konnte in verschiedenen Versuchen nachgewiesen werden. (Best *et al.*, 2006, Izumi *et al.*, 2000, Fiebeler *et al.*, 2001, Omura *et al.*, 2002). Dabei führt eine Hemmung von AP-1 zu einer verringerten Hypertrophie. Für YB-1 wurde von Samuel *et al.* (2005, 2007) in HeLa Zellen eine spezifische Hemmung von AP-1 nachgewiesen (siehe 4.5). Eine derartige Interaktion zwischen YB-1 und AP-1 kommt auch als Ursache für die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Hemmung der α_1 -adrenerg induzierten Hypertrophie in Frage.

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

YB-1 ist in der Herzmuskelzelle an der Regulation der Apoptose und auch an der Regulation einer α_1 -adrenerg induzierten Hypertrophie beteiligt. Eine Überexpression von YB-1 in Herzmuskelzellen hemmt die Apoptose-induzierende Wirkung von

TGF β . Ein direkter Einfluss auf die Aktivierung von SMAD Proteinen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Eine Überexpression von YB-1 bewirkt zusätzlich eine Hemmung der α_1 -adrenerg induzierten Hypertrophie. Somit hat YB-1 einen deutlich protektiven Effekt auf Herzmuskelzellen. Da sowohl Hypertrophie, als auch Apoptose wesentliche Mechanismen einer Herzinsuffizienz sind, kann möglicherweise durch YB-1 sogar die Entwicklung einer Herzschwäche verhindert werden.

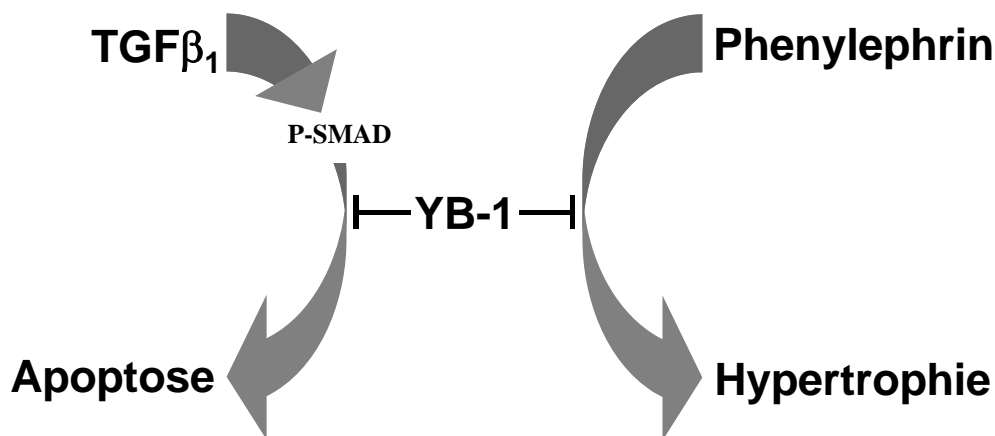


Abbildung 4.1: YB-1 hemmt sowohl die adrenerg induzierte Hypertrophie, als auch die durch TGF β_1 induzierte Apoptose.

Auf welchem Weg die Hemmung von Apoptose und Hypertrophie durch YB-1 letztendlich erfolgt, bedarf weiterer Studien. Da YB-1/SMAD-Interaktionen aus anderen Zellen bekannt sind wäre eine Untersuchung hinsichtlich einer Komplexbildung von YB-1 mit SMAD Proteinen, beispielsweise mit Hilfe einer Immunopräzipitation interessant. Mit einer Immunfluoreszenz könnte eine eventuelle Translokation von YB-1 vom Zytoplasma in den Kern nach Inkubation der Zellen mit TGF β_1 nachgewiesen werden. Auch eine Untersuchung der Wirkung von YB-1 auf Herzmuskelzellen *in vivo* wäre sicherlich aufschlussreich. Mit den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten und auf Funktionalität getesteten Adenoviren stehen für alle diese Fragestellungen die geeigneten Mittel zur Verfügung.

5 Zusammenfassung

Apoptose ist ein Prozess, der an dem Übergang von einer kompensierten kardialen Hypertrophie zur Herzinsuffizienz beteiligt ist. In adulten Kardiomyozyten ist der Transkriptionsfaktor AP-1 funktionell sowohl an der Entwicklung einer Hypertrophie, als auch an der Apoptoseinduktion beteiligt. Die Aktivierung von SMAD-Proteinen erfolgt im Herzen beim Übergang zur Herzinsuffizienz und könnte somit ein Trigger für das Umschalten einer AP-1 vermittelten Hypertrophie zur SMAD/AP-1 vermittelten Apoptose sein. Um diese Hypothese zu unterstützen, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von YB-1, einem Repressor des SMAD-Signalweges analysiert. Hierfür wurde ein YB-1 überexprimierendes Adenovirus (Ad-YB-1) und als Kontrolle ein GFP(Grün fluoreszierendes Protein)-Virus (Ad-GFP) generiert. Nach Infektion von Kardiomyozyten der Ratte mit Ad-YB-1 wurde überprüft, ob eine Überexpression von YB-1 eine durch $TGF\beta_1$ Stimulation induzierte Apoptose unterdrücken kann, und welchen Einfluss diese Überexpression auf die Hypertrophieentwicklung der Kardiomyozyten nach Stimulation mit Phenylephrin hat.

Eine Infektion von isolierten Kardiomyozyten mit Ad-YB-1 (1000 MOI) erhöhte die relative YB-1-RNA-Expression nach 24h signifikant. Die relative YB1-Protein-Expression wurde nach 24h, 30h und 36h signifikant erhöht. Mit Hilfe einer Immunfluoreszenz wurde die Überexpression ebenfalls nachgewiesen. YB-1 lag vorrangig im Zytoplasma vor. Die Infektion von Kardiomyozyten mit 1000 MOI Ad-YB-1 oder Ad-GFP zeigte sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden keine Erhöhung der Apoptose- oder Nekroserate.

Nach Induktion mit PE (10 μ M) kam es sowohl bei der Kontrollgruppe, als auch in der mit Ad-GFP infizierten Gruppe zu einer signifikanten Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche und der relativen C14-Proteinbiosyntheserate. (n=8) Eine Überexpression von YB-1 hemmte diese Hypertrophie-Induktion signifikant.

Der Nachweis der Apoptose mit zwei verschiedenen Methoden zeigte für $TGF\beta_1$ (1 ng/ml) bei nicht infizierten Kardiomyozyten und in Kardiomyozyten, die mit dem Kontrollvirus Ad-GFP infiziert wurden vermehrte Apoptose. Eine Überexpression von YB1 verhinderte dagegen diese Apoptoseinduktion

Schlussfolgerung: Erstmals konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von YB-1 sowohl zu einer Hemmung der durch $TGF\beta_1$ induzierten

Apoptose, als auch zu einer Hemmung der adrenerg induzierten Hypertrophie in adulten isolierten Kardiomyozyten führt. Das charakterisiert den Transkriptionsfaktor SMAD als ein wichtiges Signalmolekül bei der $\text{TGF}\beta_1$ induzierten Apoptose und bietet neue Perspektiven für therapeutische Ansätze.

6 Summary

Apoptosis is a process that is involved in the transition from a compensated cardiac hypertrophy to heart failure. In adult cardiomyocytes the transcription factor AP-1 is involved in the development of hypertrophy as well as in the induction of apoptosis. The activation of SMAD proteins in the heart occurs during the transition to heart failure and could therefore be a trigger for the shifting of an AP-1 mediated hypertrophy to an SMAD/AP-1-mediated apoptosis. In order to support this hypothesis, the influence of YB-1, a repressor of the SMAD signal pathway, was analyzed in this work. For this purpose an YB-1 overexpressing Adenovirus (Ad-YB-1) and a GFP (green fluorescent protein)-virus (Ad-GFP), serving as a control-virus, were generated. After infection of rat cardiomyocytes with Ad-YB-1 it was checked, whether an overexpression of YB-1 can suppress apoptosis induced by stimulation with $TGF\beta_1$, and which influence this overexpression has on the development of hypertrophy after stimulation with phenylephrin.

24h after infection of isolated cardiomyocytes with AdYB-1 (1000 MOI) the relative YB-1-RNA-expression rised significantly. The relative YB1-protein-expression increased significantly after 24h, 30h and 36h. By means of immune fluorescence, overexpression was proved, too. YB-1 was found primarily in the cytoplasma. The infection of cardiomyocytes with 1000 MOI Ad-YB-1 or Ad-GFP showed no increase of the rate of apoptosis or necrosis after 24 and 48 hours.

After induction with PE (10 μ M), either in the control group or in the group infected with Ad-GFP, a significant enlargement of the cell cross-sectional-area (CSA) and of the relative rate of ^{14}C -protein synthesis was observed. After overexpression of YB-1, this hypertrophic stimulus was blocked.

It was confirmed by two different methods that $TGF\beta_1$ (1 ng/ml) induced apoptosis in noninfected cardiomyocytes and in cardiomyocytes infected with control virus Ad-GFP. Overexpression of YB-1 prevented this induction of apoptosis.

Conclusion: For the first time it could be proven in this study that overexpression of YB-1 leads to both, an inhibition of apoptosis induced by $TGF\beta_1$, as well as an inhibition of adrenergically induced hypertrophy in isolated adult cardiomyocytes. This characterizes the transcription factor SMAD as a pivotal signalling molecule in $TGF\beta_1$ -induced apoptosis and provides new perspectives for therapeutic approaches.

7 Literaturverzeichnis

Adler, C. P., Herget, G. W., & Neuburger, M. (1998). [Regeneration of the heart muscle after myocardial infarct]. *Versicherungsmedizin* 50, 55-58.

Ashizuka, M., Fukuda, T., Nakamura, T., Shirasuna, K., Iwai, K., Izumi, H., Kohno, K., Kuwano, M., & Uchiumi, T. (2002). Novel translational control through an iron-responsive element by interaction of multifunctional protein YB-1 and IRP2. *Mol. Cell Biol.* 22, 6375-6383.

Ausubel, F.M. et al., eds. (1987-1993) *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates, Inc., in association with John Wiley & Sons, Inc.

Bader, A. G. & Vogt, P. K. (2005). Inhibition of protein synthesis by Y box-binding protein 1 blocks oncogenic cell transformation. *Mol. Cell Biol.* 25, 2095-2106.

Bang, M. L., Mudry, R. E., McElhinny, A. S., Trombitas, K., Geach, A. J., Yamasaki, R., Sorimachi, H., Granzier, H., Gregorio, C. C., & Labeit, S. (2001). Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies. *J. Cell Biol.* 153, 413-427.

Bargou, R. C., Jürchott, K., Wagener, C., Bergmann, S., Metzner, S., Bommert, K., Mapara, M. Y., Winzer, K. J., Dietel, M., Dorken, B., & Royer, H. D. (1997). Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat. Med.* 3, 447-450.

Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L., & Finberg, R. W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275, 1320-1323.

Best, P. (2006): Der Transkriptionsfaktor AP-1 übermittelt α - aber nicht β -adrenerge hypertrophe Wachstumsregulation adulter Kardiomyozyten, Dissertation, JLU Giessen, Institut für Humanphysiologie

Bishopric, N. H., Andreka, P., Slepak, T., & Webster, K. A. (2001). Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1, 141-150.

Bouvet, P. & Wolffe, A. P. (1994). A role for transcription and FRGY2 in masking maternal mRNA within *Xenopus* oocytes. *Cell* 77, 931-941.

Buxton, I. L. & Brunton, L. L. (1985). Action of the cardiac alpha 1-adrenergic receptor. Activation of cyclic AMP degradation. *J. Biol. Chem.* 260, 6733-6737.

Chen, C. Y., Gherzi, R., Andersen, J. S., Gaietta, G., Jurchott, K., Royer, H. D., Mann, M., & Karin, M. (2000). Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes Dev.* 14, 1236-1248.

Dales, S. & Chardonnet, Y. (1973). Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. IV. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movement of the inoculum. *Virology* 56, 465-483.

Davydova, E. K., Evdokimova, V. M., Ovchinnikov, L. P., & Hershey, J. W. (1997). Overexpression in COS cells of p50, the major core protein associated with mRNA, results in translation inhibition. *Nucleic Acids Res.* 25, 2911-2916.

Davis, L., Kuehl, M., Battey, J. (1994) *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier Science Publishing Company, Inc.

de Caestecker, M. P., Piek, E., & Roberts, A. B. (2000). Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1388-1402.

Dennler, S., Goumans, M. J., & ten, D. P. (2002). Transforming growth factor beta signal transduction. *J. Leukoc. Biol.* 71, 731-740.

Derynck, R. & Feng, X. H. (1997). TGF-beta receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1333, F105-F150.

Deten, A., Holzl, A., Leicht, M., Barth, W., & Zimmer, H. G. (2001). Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. *J. Mol. Cell Cardiol.* 33, 1191-1207.

Didier, D. K., Schiffenbauer, J., Woulfe, S. L., Zacheis, M., & Schwartz, B. D. (1988). Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 7322-7326.

Dooley, S., Said, H. M., Gressner, A. M., Floege, J., En-Nia, A., & Mertens, P. R. (2006). Y-box protein-1 is the crucial mediator of antifibrotic interferon-gamma effects. *J. Biol. Chem.* 281, 1784-1795.

Ellis, R. E., Yuan, J. Y., & Horvitz, H. R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 663-698.

Euler-Taimor, G. & Heger, J. (2006). The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* 69, 15-25.

Evdokimova, V., Ruzanov, P., Anglesio, M. S., Sorokin, A. V., Ovchinnikov, L. P., Buckley, J., Triche, T. J., Sonenberg, N., & Sorensen, P. H. (2006). Akt-mediated YB-1 phosphorylation activates translation of silent mRNA species. *Mol. Cell Biol.* 26, 277-292.

Evdokimova, V., Ruzanov, P., Imataka, H., Raught, B., Svitkin, Y., Ovchinnikov, L. P., & Sonenberg, N. (2001). The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *EMBO J.* 20, 5491-5502.

Evdokimova, V. M., Wei, C. L., Sitikov, A. S., Simonenko, P. N., Lazarev, O. A., Vasilenko, K. S., Ustinov, V. A., Hershey, J. W., & Ovchinnikov, L. P. (1995). The

major protein of messenger ribonucleoprotein particles in somatic cells is a member of the Y-box binding transcription factor family. *J. Biol. Chem.* 270, 3186-3192.

Fiebeler, A., Schmidt, F., Muller, D. N., Park, J. K., Dechend, R., Bieringer, M., Shagdarsuren, E., Breu, V., Haller, H., & Luft, F. C. (2001). Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor-kappaB activation in angiotensin II-induced cardiac injury. *Hypertension* 37, 787-793.

Freude, B., Masters, T. N., Robicsek, F., Fokin, A., Kostin, S., Zimmermann, R., Ullmann, C., Lorenz-Meyer, S., & Schaper, J. (2000). Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J. Mol. Cell Cardiol.* 32, 197-208.

Glockzin, G., Mantwill, K., Jürchott, K., Bernshausen, A., Ladhoff, A., Royer, H. D., Gansbacher, B., & Holm, P. S. (2006). Characterization of the recombinant adenovirus vector AdYB-1: implications for oncolytic vector development. *J. Virol.* 80, 3904-3911.

Graumann, P. & Marahiel, M. A. (1996a). A case of convergent evolution of nucleic acid binding modules. *Bioessays* 18, 309-315.

Graumann, P. & Marahiel, M. A. (1996b). Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. *Arch. Microbiol.* 166, 293-300.

Guerra, S., Leri, A., Wang, X., Finato, N., Di, L. C., Beltrami, C. A., Kajstura, J., & Anversa, P. (1999). Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ. Res.* 85, 856-866.

Handbuch Pferdepraxis (2006), Enke Verlag, 3.Auflage

Hao, J., Ju, H., Zhao, S., Junaid, A., Scammell-La, F. T., & Dixon, I. M. (1999). Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF-beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing. *J. Mol. Cell Cardiol.* 31, 667-678.

Hao, J., Wang, B., Jones, S. C., Jassal, D. S., & Dixon, I. M. (2000). Interaction between angiotensin II and Smad proteins in fibroblasts in failing heart and in vitro. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 279, H3020-H3030.

Hayakawa, H., Uchiumi, T., Fukuda, T., Ashizuka, M., Kohno, K., Kuwano, M., & Sekiguchi, M. (2002). Binding capacity of human YB-1 protein for RNA containing 8-oxoguanine. *Biochemistry* 41, 12739-12744.

Heldin, C. H., Miyazono, K., & ten, D. P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465-471.

Higashi, K., Inagaki, Y., Fujimori, K., Nakao, A., Kaneko, H., & Nakatsuka, I. (2003a). Interferon-gamma interferes with transforming growth factor-beta signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3. *J. Biol. Chem.* 278, 43470-43479.

Higashi, K., Inagaki, Y., Suzuki, N., Mitsui, S., Mauviel, A., Kaneko, H., & Nakatsuka, I. (2003b). Y-box-binding protein YB-1 mediates transcriptional repression of human alpha 2(I) collagen gene expression by interferon-gamma. *J. Biol. Chem.* 278, 5156-5162.

Hipfel, R., Schitteck, B., Bodingbauer, Y., & Garbe, C. (2000). Specifically regulated genes in malignant melanoma tissues identified by subtractive hybridization. *Br. J. Cancer* 82, 1149-1157.

Ikeuchi, M., Tsutsui, H., Shiomi, T., Matsusaka, H., Matsushima, S., Wen, J., Kubota, T., & Takeshita, A. (2004). Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. *Cardiovasc. Res.* 64, 526-535.

Inagaki, Y., Kushida, M., Higashi, K., Itoh, J., Higashiyama, R., Hong, Y. Y., Kawada, N., Namikawa, K., Kiyama, H., Bou-Gharios, G., Watanabe, T., Okazaki, I., & Ikeda, K. (2005). Cell type-specific intervention of transforming growth factor beta/Smad

signaling suppresses collagen gene expression and hepatic fibrosis in mice. *Gastroenterology* 129, 259-268.

Izumi, H., Imamura, T., Nagatani, G., Ise, T., Murakami, T., Uramoto, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Yoshida, Y., Nomoto, M., Okamoto, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Funa, K., & Kohno, K. (2001). Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'-->5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Res.* 29, 1200-1207.

Izumi, Y., Kim, S., Zhan, Y., Namba, M., Yasumoto, H., & Iwao, H. (2000). Important role of angiotensin II-mediated c-Jun NH(2)-terminal kinase activation in cardiac hypertrophy in hypertensive rats. *Hypertension* 36, 511-516.

Jürchott, K., Bergmann, S., Stein, U., Walther, W., Janz, M., Manni, I., Piaggio, G., Fietze, E., Dietel, M., & Royer, H. D. (2003). YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J. Biol. Chem.* 278, 27988-27996.

Kamalov, G., Varma, B. R., Lu, L., Sun, Y., Weber, K. T., & Guntaka, R. V. (2005). Expression of the multifunctional Y-box protein, YB-1, in myofibroblasts of the infarcted rat heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 239-244.

Kamura, T., Yahata, H., Amada, S., Ogawa, S., Sonoda, T., Kobayashi, H., Mitsumoto, M., Kohno, K., Kuwano, M., & Nakano, H. (1999). Is nuclear expression of Y box-binding protein-1 a new prognostic factor in ovarian serous adenocarcinoma? *Cancer* 85, 2450-2454.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.

Kloks, C. P., Spronk, C. A., Lasonder, E., Hoffmann, A., Vuister, G. W., Grzesiek, S., & Hilbers, C. W. (2002). The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1. *J. Mol. Biol.* 316, 317-326.

Knott, H. (2008): Stress-induzierte posttranslationale Modifikationen des Y-box Proteins-1 (YB-1) beinhalten Acetylierung und Phosphorylierung, Dissertation, RWTH Aachen, Fachbereich Medizin

Kohno, K., Izumi, H., Uchiumi, T., Ashizuka, M., & Kuwano, M. (2003). The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays* 25, 691-698.

Koike, K., Uchiumi, T., Ohga, T., Toh, S., Wada, M., Kohno, K., & Kuwano, M. (1997). Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Lett.* 417, 390-394.

Kojic, S., Medeot, E., Guccione, E., Krmac, H., Zara, I., Martinelli, V., Valle, G., & Faulkner, G. (2004). The Ankrd2 protein, a link between the sarcomere and the nucleus in skeletal muscle. *J. Mol. Biol.* 339, 313-325.

Kolluri, R., Torrey, T. A., & Kinniburgh, A. J. (1992). A CT promoter element binding protein: definition of a double-strand and a novel single-strand DNA binding motif. *Nucleic Acids Res.* 20, 111-116.

Landsman, D. (1992). RNP-1, an RNA-binding motif is conserved in the DNA-binding cold shock domain. *Nucleic Acids Res.* 20, 2861-2864.

Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 913-949.

Lasham, A., Lindridge, E., Rudert, F., Onrust, R., & Watson, J. (2000). Regulation of the human fas promoter by YB-1, Puralpha and AP-1 transcription factors. *Gene* 252, 1-13.

Lee, C., Dhillon, J., Wang, M. Y., Gao, Y., Hu, K., Park, E., Astanehe, A., Hung, M. C., Eirew, P., Eaves, C. J., & Dunn, S. E. (2008). Targeting YB-1 in HER-2 overexpressing breast cancer cells induces apoptosis via the mTOR/STAT3 pathway and suppresses tumor growth in mice. *Cancer Res.* 68, 8661-8666.

Levy, D., Kenchaiah, S., Larson, M. G., Benjamin, E. J., Kupka, M. J., Ho, K. K., Murabito, J. M., & Vasan, R. S. (2002). Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N. Engl. J. Med.* 347, 1397-1402.

Li, R. C., Ping, P., Zhang, J., Wead, W. B., Cao, X., Gao, J., Zheng, Y., Huang, S., Han, J., & Bolli, R. (2000). PKCepsilon modulates NF-kappaB and AP-1 via mitogen-activated protein kinases in adult rabbit cardiomyocytes. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 279, H1679-H1689.

Liberati, N. T., Datto, M. B., Frederick, J. P., Shen, X., Wong, C., Rougier-Chapman, E. M., & Wang, X. F. (1999). Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 4844-4849.

MacDonald, G. H., Itoh-Lindstrom, Y., & Ting, J. P. (1995). The transcriptional regulatory protein, YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA promoter. *J. Biol. Chem.* 270, 3527-3533.

Marenstein, D. R., Ocampo, M. T., Chan, M. K., Altamirano, A., Basu, A. K., Boorstein, R. J., Cunningham, R. P., & Teebor, G. W. (2001). Stimulation of human endonuclease III by Y box-binding protein 1 (DNA-binding protein B). Interaction between a base excision repair enzyme and a transcription factor. *J. Biol. Chem.* 276, 21242-21249.

Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753-791.

Mathias, P., Galleno, M., & Nemerow, G. R. (1998). Interactions of soluble recombinant integrin alphav beta5 with human adenoviruses. *J. Virol.* 72, 8669-8675.

Matsumoto, K. & Wolffe, A. P. (1998). Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol.* 8, 318-323.

Minich, W. B. & Ovchinnikov, L. P. (1992). Role of cytoplasmic mRNP proteins in translation. *Biochimie* 74, 477-483.

Miwa, A., Higuchi, T., & Kobayashi, S. (2006). Expression and polysome association of YB-1 in various tissues at different stages in the lifespan of mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 1675-1681.

Morgan, H. E., Jefferson, L. S., Wolpert, E. B., & Rannels, D. E. (1971). Regulation of protein synthesis in heart muscle. II. Effect of amino acid levels and insulin on ribosomal aggregation. *J. Biol. Chem.* 246, 2163-2170.

Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J. L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N. E., Heldin, C. H., & ten, D. P. (1997). Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 389, 631-635.

Narula, J., Haider, N., Virmani, R., DiSalvo, T. G., Kolodgie, F. D., Hajjar, R. J., Schmidt, U., Semigran, M. J., Dec, G. W., & Khaw, B. A. (1996). Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N. Engl. J. Med.* 335, 1182-1189.

Nekrasov, M. P., Ivshina, M. P., Chernov, K. G., Kovrigina, E. A., Evdokimova, V. M., Thomas, A. A., Hershey, J. W., & Ovchinnikov, L. P. (2003). The mRNA-binding protein YB-1 (p50) prevents association of the eukaryotic initiation factor eIF4G with mRNA and inhibits protein synthesis at the initiation stage. *J. Biol. Chem.* 278, 13936-13943.

Oda, Y., Sakamoto, A., Shinohara, N., Ohga, T., Uchiumi, T., Kohno, K., Tsuneyoshi, M., Kuwano, M., & Iwamoto, Y. (1998). Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma. *Clin. Cancer Res.* 4, 2273-2277.

Omura, T., Yoshiyama, M., Yoshida, K., Nakamura, Y., Kim, S., Iwao, H., Takeuchi, K., & Yoshikawa, J. (2002). Dominant negative mutant of c-Jun inhibits cardiomyocyte hypertrophy induced by endothelin 1 and phenylephrine. *Hypertension* 39, 81-86.

Park, S. H. (2005). Fine tuning and cross-talking of TGF-beta signal by inhibitory Smads. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38, 9-16.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.

Physiologie der Haustiere (2000) Engelhardt, W. v., Breves, G., Enke im Hippokrates Verlag GmbH 1.Auflage

Pinson, A., Schlüter, K. D., Zhou, X. J., Schwartz, P., Kessler-Icekson, G., & Piper, H. M. (1993). Alpha- and beta-adrenergic stimulation of protein synthesis in cultured adult ventricular cardiomyocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 25, 477-490.

Pönicke, K., Schlüter, K. D., Heinroth-Hoffmann, I., Seyfarth, T., Goldberg, M., Osten, B., Piper, H. M., & Brodde, O. E. (2001). Noradrenaline-induced increase in protein synthesis in adult rat cardiomyocytes: involvement of only alpha1A-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 364, 444-453.

Praktikum der Hundeklinik (1989), Paul Parey Verlag, 6. Auflage

Pschyrembel klinisches Wörterbuch (1998), de Gruyter Verlag, 258. Auflage

Qin, B. Y., Chacko, B. M., Lam, S. S., de Caestecker, M. P., Correia, J. J., & Lin, K. (2001). Structural basis of Smad1 activation by receptor kinase phosphorylation. *Mol. Cell* 8, 1303-1312.

Reddy, D.S., Singh, M., Chopra, K. (1996) Signalling mechanisms of cardiac hypertrophy. *Indian Journal of Pharmacology*; 28: 58-71

Rosenkranz, S. (2004). TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc. Res.* 63, 423-432.

Russell, W. C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.* 81, 2573-2604.

Ruzanov, P. V., Evdokimova, V. M., Korneeva, N. L., Hershey, J. W., & Ovchinnikov, L. P. (1999). Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 20), 3487-3496.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sam, F., Sawyer, D. B., Chang, D. L., Eberli, F. R., Ngoy, S., Jain, M., Amin, J., Apstein, C. S., & Colucci, W. S. (2000). Progressive left ventricular remodeling and apoptosis late after myocardial infarction in mouse heart. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 279, H422-H428.

Samuel, S., Beifuss, K. K., & Bernstein, L. R. (2007). YB-1 binds to the MMP-13 promoter sequence and represses MMP-13 transactivation via the AP-1 site. *Biochim. Biophys. Acta* 1769, 525-531.

Samuel, S., Twizere, J. C., & Bernstein, L. R. (2005). YB-1 represses AP1-dependent gene transactivation and interacts with an AP-1 DNA sequence. *Biochem. J.* 388, 921-928.

Schitteck, B., Psenner, K., Sauer, B., Meier, F., Iftner, T., & Garbe, C. (2007). The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance. *Int. J. Cancer* 120, 2110-2118.

Schlüter, K. D., Goldberg, Y., Taimor, G., Schäfer, M., & Piper, H. M. (1998). Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation in the hypertrophic growth of adult ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 40, 174-181.

Schlüter, K. D. & Piper, H. M. (1992). Trophic effects of catecholamines and parathyroid hormone on adult ventricular cardiomyocytes. *Am. J. Physiol* 263, H1739-H1746.

Schlüter, K. D. & Schreiber, D. (2005). Adult ventricular cardiomyocytes: isolation and culture. *Methods Mol. Biol.* 290, 305-314.

Schneiders, D., Heger, J., Best, P., Michael, P. H., & Taimor, G. (2005). SMAD proteins are involved in apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 67, 87-96.

Schnuchel, A., Wiltscheck, R., Czisch, M., Herrler, M., Willimsky, G., Graumann, P., Marahiel, M. A., & Holak, T. A. (1993). Structure in solution of the major cold-shock protein from *Bacillus subtilis*. *Nature* 364, 169-171.

Shi, Y. & Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700.

Shibahara, K., Sugio, K., Osaki, T., Uchiumi, T., Maehara, Y., Kohno, K., Yasumoto, K., Sugimachi, K., & Kuwano, M. (2001). Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 7, 3151-3155.

Shibao, K., Takano, H., Nakayama, Y., Okazaki, K., Nagata, N., Izumi, H., Uchiumi, T., Kuwano, M., Kohno, K., & Itoh, H. (1999). Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II alpha genes in human colorectal carcinomas. *Int. J. Cancer* 83, 732-737.

Shioi, T., McMullen, J. R., Kang, P. M., Douglas, P. S., Obata, T., Franke, T. F., Cantley, L. C., & Izumo, S. (2002). Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol. Cell Biol.* 22, 2799-2809.

Stein, U., Jürchott, K., Walther, W., Bergmann, S., Schlag, P. M., & Royer, H. D. (2001). Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. *J. Biol. Chem.* 276, 28562-28569.

Stickeler, E., Fraser, S. D., Honig, A., Chen, A. L., Berget, S. M., & Cooper, T. A. (2001). The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative exon v4. *EMBO J.* 20, 3821-3830.

Sun, W., Hou, F., Panchenko, M. P., & Smith, B. D. (2001). A member of the Y-box protein family interacts with an upstream element in the alpha1(I) collagen gene. *Matrix Biol.* 20, 527-541.

Swamynathan, S. K., Varma, B. R., Weber, K. T., & Guntaka, R. V. (2002). Targeted disruption of one allele of the Y-box protein gene, Chk-YB-1b, in DT40 cells results in major defects in cell cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 451-457.

Tafuri, S. R. & Wolffe, A. P. (1992). DNA binding, multimerization, and transcription stimulation by the *Xenopus* Y box proteins in vitro. *New Biol.* 4, 349-359.

Tafuri, S. R. & Wolffe, A. P. (1993). Selective recruitment of masked maternal mRNA from messenger ribonucleoprotein particles containing FRGY2 (mRNP4). *J. Biol. Chem.* 268, 24255-24261.

Taimor, G., Schlüter, K. D., Best, P., Helmig, S., & Piper, H. M. (2004). Transcription activator protein 1 mediates alpha- but not beta-adrenergic hypertrophic growth responses in adult cardiomyocytes. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 286, H2369-H2375.

Takemoto, Y., Yoshiyama, M., Takeuchi, K., Omura, T., Komatsu, R., Izumi, Y., Kim, S., & Yoshikawa, J. (1999). Increased JNK, AP-1 and NF-kappa B DNA binding activities in isoproterenol-induced cardiac remodeling. *J. Mol. Cell Cardiol.* 31, 2017-2030.

Tea, B. S., Dam, T. V., Moreau, P., Hamet, P., & deBlois, D. (1999). Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. Temporal regulation and spatial heterogeneity. *Hypertension* 34, 229-235.

Ting, J. P., Painter, A., Zeleznik-Le, N. J., MacDonald, G., Moore, T. M., Brown, A., & Schwartz, B. D. (1994). YB-1 DNA-binding protein represses interferon gamma activation of class II major histocompatibility complex genes. *J. Exp. Med.* 179, 1605-1611.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184, 39-51.

Wang, B., Hao, J., Jones, S. C., Yee, M. S., Roth, J. C., & Dixon, I. M. (2002). Decreased Smad 7 expression contributes to cardiac fibrosis in the infarcted rat heart. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 282, H1685-H1696.

Weil, J. & Schunkert, H. (2006). Pathophysiology of chronic heart failure. *Clin. Res. Cardiol.* 95 Suppl 4, 1-15.

Wolffe, A. P. (1994). Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *Bioessays* 16, 245-251.

Wu, J. W., Hu, M., Chai, J., Seoane, J., Huse, M., Li, C., Rigotti, D. J., Kyin, S., Muir, T. W., Fairman, R., Massague, J., & Shi, Y. (2001). Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Mol. Cell* 8, 1277-1289.

Wyllie, A. H. (1997). Apoptosis and carcinogenesis. *Eur. J. Cell Biol.* 73, 189-197.

Wyllie, A. H., Kerr, J. F., & Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306.

Yamamura, Y., Hua, X., Bergelson, S., & Lodish, H. F. (2000). Critical role of Smads and AP-1 complex in transforming growth factor-beta -dependent apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275, 36295-36302.

Zhou, Y. T., Grayburn, P., Karim, A., Shimabukuro, M., Higa, M., Baetens, D., Orci, L., & Unger, R. H. (2000). Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 1784-1789.

Zou, Y. & Chien, K. R. (1995). EFIA/YB-1 is a component of cardiac HF-1A binding activity and positively regulates transcription of the myosin light-chain 2v gene. *Mol. Cell Biol.* 15, 2972-2982.

8 Danksagung

Mein Dank gilt einer Vielzahl von Menschen, die mich auf dem Weg zur Promotion begleitet haben und die nicht alle namentlich genannt werden.

Danken möchte ich Frau Professor Gerhild Euler des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Humanmedizin für die Bereitstellung des Themas, für ihre Geduld und Freundlichkeit, sowie für die nicht selbstverständliche finanzielle Unterstützung in Form eines Hausstipendiums.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Jacqueline Heger bedanken, die mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mit ihrer fachlichen Unterstützung, sowie vielen kreativen Ideen außerordentlich viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Sie war mir durch ihre herzliche und geduldige Art immer eine große Stütze.

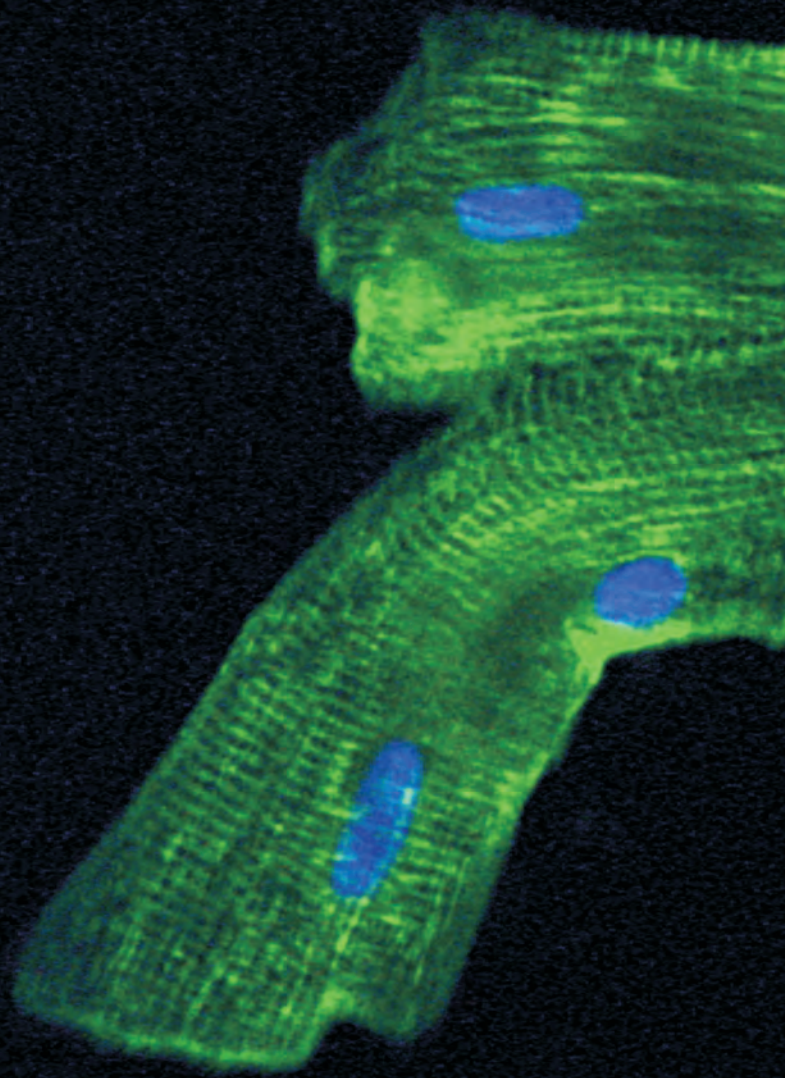
Herrn Prof. Dr. M. Diener danke ich für die freundliche Betreuung und die schnelle Korrektur dieser Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

All meinen Kollegen im Physiologischen Institut möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Ganz besonderen Dank richte ich an alle Technischen Assistenten für ihre Geduld und Hilfsbereitschaft.

Ein besonderer Dank gilt Fr. Dr. Bettina Meyering, Fr. Dr. Anja Röthig und den anderen Doktoranden des Instituts, die durch ein außergewöhnliches Arbeitsklima die Zeit am Institut und darüber hinaus wesentlich bereichert haben.

Mein persönlicher Dank gilt aber vor allem meiner geliebten Freundin Franziska, die mir die nötige Kraft gegeben und unermüdlich, selbst in schwierigen Zeiten zu mir gestanden hat.

Meinen Eltern danke ich für alles.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5574-8



9 783835 195574 5

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de